



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

Munir Regini Paião

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1 E M2 NA RESPOSTA
CONTRA O FUNGO
DIMÓRFICO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*.

CAMPINAS
2016

Munir Regini Paião

**Avaliação da participação de macrófagos M1 e M2 na resposta contra o
fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*.**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ORIENTADOR: Dr. Ronei Luciano Mamoni

COORIENTADORA: Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
MUNIR REGINI PAIÃO, E ORIENTADO PELO PROFESSOR
DR. RONEI LUCIANO MAMONI

CAMPINAS
2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2012/14828-8

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

P152a Paião, Munir Regini, 1983-
Avaliação da participação de macrófagos M1 e M2 na resposta contra o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* / Munir Regini Paião. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Ronei Luciano Mamoni.
Coorientador: Maria Heloisa de Souza Lima Blotta.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Paracoccidioides. 3. Macrófagos. 4. Imunidade inata. I. Mamoni, Ronei Luciano. II. Blotta, Maria Heloisa de Souza Lima, 1953-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the participation of M1 and M2 macrophages in the immune response against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*

Palavras-chave em inglês:

Paracoccidioidomycosis

Paracoccidioides

Macrophages

Immunity, Innate

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Ronei Luciano Mamoni [Orientador]

Sandro Rogério de Almeida

Angela Maria Victoriano de Campos Soares

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Data de defesa: 24-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE
DOUTORADO**

MUNIR REGINI PAIÃO

ORIENTADOR: PROF. DR. RONEI LUCIANO MAMONI

**COORIENTADOR: PROFA. DRA. MARIA HELOISA DE SOUZA LIMA
BLOTTA**

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. RONEI LUCIANO MAMONI**
 - 2. PROF. DR. SANDRO ROGÉRIO DE ALMEIDA**
 - 3. PROFA. DRA. ANGELA MARIA VICTORIANO DE CAMPOS
SOARES**
 - 4. PROFA. DRA. WIRLA MARIA DA SILVA CUNHA TAMASHIRO**
 - 5. PROFA. DRA. NICOLA AMANDA CONRAN ZORZETTO**
-

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da
banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 24 de fevereiro de 2016

DEDICATÓRIA

A Deus e aos meus pais, me deram a vida,
educação e principalmente amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus,

Aos meus pais Izildo e Maria Helena, por me respeitarem e me incentivarem a todo o instante, sendo a base da minha vida. À minha irmã Christiane, pela sua amizade, conselhos e por estar sempre presente.

Ao meu orientador Dr. Ronei Luciano Mamoni, pelas críticas, correções e ajuda. Uma pessoa que me acompanhou desde meu trabalho de conclusão de curso na graduação, foi e sempre será para mim um belo exemplo de profissional, inteligência e ajuda em minha caminhada acadêmica. Muito Obrigado.

À Dra. Maria Heloísa de Souza Lima Blotta, por me receber e ajudar sempre que possível em seu laboratório.

Aos colegas de laboratório, (alunos atuais e aos que já concluíram seus respectivos cursos de mestrado e doutorado, pós doutorado e funcionários), Amauri, Ana Lucia, Carol, Fernanda, Eliane, Fábio, Kamille, Larissa, Liana, Lisandra, Luciana, Marcela, Márcia Fornazim, Rômulo, Rosiane e Xinaida sempre dispostos a ajudar e agregar na realização do projeto.

À minha querida amiga Lívia, sempre me ajudando, uma parceira de bancada e muitas vezes ficando até tarde comigo realizando testes, uma pessoa super habilidosa, solícita, competente, profissional e acima de tudo humilde.

À Rosiane, pela confecção das lâminas de imunohistoquímica, por ter me ajudado com dicas sobre a técnica.

À Profa. Dra Ângela Maria Victoriano de Campos Soares da Unesp de Botucatu, a qual cedeu gentilmente a cepa do fungo Pb18. E a Luzia e Edson (funcionários do laboratório de Microbiologia), os quais cultivaram e mantiveram a cepa do fungo.

Ao Dr. Alexandre Nowill por ceder o citômetro de fluxo para a leitura de alguns experimentos e ao auxílio prestado por Márcia, Carol e Angelo durante o uso do equipamento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro (Processo número 2012/14828-8).

Muito Obrigado.

RESUMO

Introdução: A Paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica endêmica de maior incidência na América Latina. A doença é causada por fungos termo-dimórficos do gênero *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* e *P. lutzii*). Dentre as células do sistema imunológico inato, os macrófagos desempenham papel preponderante no reconhecimento e remoção de patógenos e na indução da resposta adaptativa em diversas doenças, incluindo a PCM. Atualmente, sabe-se que estas células podem exibir fenótipos, dependendo do microambiente de diferenciação, com funções efetoras distintas sendo classificados como: M1 (pró-inflamatórios) ou M2 (anti-inflamatórios). **Objetivos:** Os objetivos de nosso estudo foram: avaliar aspectos funcionais e fenotípicos dos macrófagos M1 e M2 após o estímulo *in vitro* com células leveduriformes de *P. brasiliensis*, incluindo o papel dessas células na diferenciação de linfócitos T; e caracterizar os macrófagos em tecidos de mucosa oral e linfonodos provenientes de pacientes com PCM. **Métodos:** Para isso monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram purificados e diferenciados em M1 e M2 pelo tratamento com GM-CSF ou M-CSF, respectivamente, por 5 dias. Após a diferenciação, os macrófagos foram estimulados com leveduras do fungo (cepa Pb18) e avaliados fenotípica e funcionalmente quanto a: expressão de marcadores de superfície, capacidade de formação de granuloma, atividade fagocítica e fungicida, produção de arginase-1, H_2O_2 e NO e produção de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases de matriz (MMPs). Além disso, macrófagos M1 e M2 foram cocultivados com linfócitos T autólogos para avaliar a capacidade de diferenciação dessas células. A caracterização dos macrófagos nos tecidos de pacientes foi feita pela técnica de imuno-histoquímica. **Resultados:** Nossos resultados mostraram que macrófagos M1 estimulados com o fungo produzem maiores quantidades de IL-12p70, IL-6, TNF- α , MMP-1, MMP-9, H_2O_2 e NO; expressam maiores quantidades de CD1a, CD80, CD86, MHC de classe II e dectina-1, e maior capacidade de formar granulomas quando comparados a macrófagos M2. Por outro lado, macrófagos M2 apresentaram maior produção de IL-10, IL-1 β e arginase-1; expressão aumentada de CD209, CD205, CD206, CD163, CD36, CD14, CD16, TLR2 e TLR4 e maior capacidade fagocítica e fungicida. Além disso, obtivemos que tanto macrófagos M1 quanto macrófagos M2 induzem a

ativação e diferenciação de linfócitos T, embora com perfis diferenciados. Enquanto macrófagos M1 induzem a diferenciação de linfócitos Th1 e Th17, macrófagos M2 induziram a diferenciação de células Th2 e Treg. Também observamos que nas lesões de pacientes com a forma mais grave da PCM (Linfonodos – Forma aguda) houve o predomínio de macrófagos com características M2 (alta expressão de CD206 e produção de IL-10). **Conclusões:** Nossos resultados mostram que macrófagos M1 e M2 podem participar de maneira diferencial, mas complementar da resposta inicial à infecção pelo *P. brasiliensis*, assim como da ativação de diferenciação de linfócitos T. Macrófagos M1 podem desempenhar um papel importante na inicialização da resposta inflamatória e contenção da disseminação do fungo, podendo, contudo levar a uma resposta inflamatória exacerbada e destruição tecidual. Enquanto que macrófagos M2 seriam importantes para a supressão de uma resposta inflamatória exacerbada, mas ao mesmo tempo podendo levar à disseminação da doença.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Paracoccidioides. Macrófagos.

Imunidade inata.

ABSTRACT

Background: Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis with the highest incidence in Latin America. It is caused by thermal dimorphic fungus from *Paracoccidioides* genus (*P. brasiliensis* e *P. lutzii*). Among the cells of the innate immune system, macrophages play a preponderant role in the recognition and removal of pathogens and in the determination of the adaptive immune response in several diseases, including PCM. It is known that these cells can acquire distinct phenotypes, depending on their differentiation microenvironment, presenting diverse effector functions being classified as: M1 (pro-inflammatory) or M2 (anti-inflammatory). **Objective:** The aims of this study were: to evaluate the phenotypic and functional characteristics of M1 and M2 macrophages when stimulated *in vitro* with *P. brasiliensis* yeast cells, including their role in the activation and differentiation of T lymphocytes; and the characterization of these macrophages in oral-mucosa and lymph node biopsies from PCM patients. **Methods:** Monocytes from peripheral blood of healthy donors were purified and differentiated in M1 or M2 macrophages by the treatment with GM-CSF or M-CSF, respectively, for 5 days. After differentiation the two types of macrophages were stimulated with *P. brasiliensis* yeast cells (Pb18 strain) and evaluated in relation to the following phenotypic and functional characteristics: surface markers expression, granuloma formation capacity, fungicidal and phagocytic activity, production of arginase-1, H₂O₂ and NO and production of cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases (MMPs). Furthermore, we co-cultured M1 or M2 macrophages stimulated by *Pb18* yeast cells with autologous purified T lymphocytes. The characterization of macrophages in biopsies from patients was performed by de immune histochemical technique. **Results:** We found that M1 cells, when challenged with *Pb18* yeast cells, presented higher productions of IL12p70, IL-6, TNF- α , MMP-1, MMP-9, H₂O₂ and NO; higher expression of CD1a, CD80, CD86, MHC II and dectin-1; a higher capacity to form granuloma when compared with M2 cells. On the other hand, M2 cells presented higher productions of IL10, IL1- β and arginase-1; an elevated expression of CD209, CD205, CD206, CD163, CD36, CD14, CD16, TLR2 and TLR4, besides a higher fungicidal and phagocytic capability. Moreover, we found that both M1 and M2 macrophages induced the activation of T lymphocytes which presented opposing profiles. Whereas M1 macrophages induced the differentiation of Th1 and Th17 lymphocytes, M2

macrophages stimulated the differentiation of Th2 e Treg lymphocytes. We also observed in the lesions of acute form patients (lymph nodes), the predominance of macrophages presenting M2 characteristics (high expression of CD206 and IL-10 production). **Conclusion:** Our results show that both M1 and M2 macrophages can develop opposing, but complementary roles in the initial immune response against the *P. brasiliensis* infection, as well as in the activation and differentiation of T lymphocytes. M1 macrophages can be important to the inicial inflammatory response and restraintment of fungal dissemination, though can contribute to an exacerbated inflammatory response and tissue damage. M2 macrophages, on the other hand, can be important to the control of the inflammatory response, but contribute to the dissemination of the fungus.

Key words: Paracoccidioidomycosis. Paracoccidioides. Macrophages. Immunity, innate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1	Deliniamento experimental: Células CD14 ⁺ diferenciadas <i>in vitro</i> em macrófagos M1 e M2 e posteriormente avaliadas quanto aos seus fenótipos e funções quando cultivadas na presença de leveduras do <i>P. Brasiliensis</i> . Caracterização de marcadores associados a macrófagos M1 e M2 em lesões de pacientes.	29
Figura 3.2	Análise por citometria de fluxo do fenótipo de células CD14 ⁺ submetidas às condições de cultura para diferenciação de macrófagos em M1 e M2.	32
Figura 3.3	Resultados do ELISA para confirmação da cobertura das beads com antígenos derivados de <i>P. Brasiliensis</i> .	37
Figura 3.4	Fotomicrografias representativas dos granulomas formados <i>in vitro</i> por macrófagos M1 cocultivados com esferas recobertas com o antígeno celular (cAg) de <i>P. brasiliensis</i> .	39
Figura 3.5	Dot-plots representativos da forma de análise da produção de citocinas por linfócitos cocultivados com macrófagos M1 ou M2.	44
Figura 4.1	Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células positivas para CD1a, CD209, CD205, CD163 e CD36 ou da intensidade média de fluorescência (IMF) CD206, em macrófagos M1 e M2 mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18).	48
Figura 4.2	Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células positivas para CD16 ou da intensidade média de fluorescência (IMF) CD14 em macrófagos M1 e M2 mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18).	49
Figura 4.3	Análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência (IMF) para dectina-1 e da porcentagem de células positivas para TLR2 e TLR4 em macrófagos M1 e M2 mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18).	50
Figura 4.4	Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células positivas para CD80 e CD86 ou da intensidade média de fluorescência (IMF) para MHC de classe I, MHC de classe II e CD86, em macrófagos M1 e M2 mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18).	51
Figura 4.5	Avaliação da produção de IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1b, IL-10, IL-23, TGF- β , IL-37 por macrófagos M1 e M2, mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18).	53

Figura 4.6	Avaliação da produção de CXCL8, CXCL9, CXCL10 e CCL5 por macrófagos M1 e M2, mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) .	54
Figura 4.7	Avaliação da produção de MMP1, MMP2, MMP3 e MMP9 por macrófagos M1 e M2, mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18).	55
Figura 4.8	Avaliação da formação de granulomas <i>in vitro</i> de macrófagos M1 e M2 na presença de esferas não sensibilizadas (SE) ou recobertas com diferentes tipos de antígenos (CFA, cAg, gp43 e PPD).	56
Figura 4.9	Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos M1 e M2 co-cultivados com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> sem tratamento ou opsonizadas com soro de pacientes com PCM marcados com CFSE.	58
Figura 4.10	Análise por microscopia de fluorescência da fagocitose por macrófagos M1 de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> marcadas com CFSE ou de partículas de dextran marcadas com FITC.	59
Figura 4.11	Análise por microscopia de fluorescência da fagocitose por macrófagos M2 de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> marcadas com CFSE ou de partículas de dextran marcadas com FITC.	60
Figura 4.12	Análise da capacidade fungicida de macrófagos M1 e M2 contra leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> sem tratamento (Pb18) ou opsonizadas com soro de pacientes com PCM.	61
Figura 4.13	Avaliação da produção de H ₂ O ₂ por macrófagos M1 e M2 mantidos sem estímulo ou estimulados com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> ou com PMA (50ng/mL) por citometria de fluxo	62
Figura 4.14	Avaliação da produção de NO por Macrófagos M1 e M2 mantidos sem estímulo ou estimulados com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> ou com PMA.	63
Figura 4.15	Avaliação da atividade da arginase-I em culturas de macrófagos M1 e M2 estimulados ou não com leveduras de <i>Pb18</i> .	64
Figura 4.16	Avaliação da produção de IFN- γ , IL-17, IL-4 e IL-22 por linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ e linfócitos T CD3 ⁺ CD8 ⁺ na presença de macrófagos M1 e M2, mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) .	65
Figura 4.17	Avaliação da frequência de células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ em coculturas de macrófagos M1 e M2, mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> (Pb18) .	66
Figura 4.18	Análise por imuno-histoquímica da expressão de CD3 em lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com PCM em comparação com cortes histológicos de	68

	indivíduos com processo inflamatório leve (mucosa oral) e provenientes de tireidectomia (Linfonodos), sem correlação com a PCM.	
Figura 4.19	Análise por imuno-histoquímica da expressão de CD8 em lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com PCM em comparação com cortes histológicos de indivíduos com processo inflamatório leve (mucosa oral) e provenientes de tireidectomia (Linfonodos), sem correlação com a PCM.	69
Figura 4.20	Análise por imuno-histoquímica da expressão de CD68 em lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com PCM em comparação com cortes histológicos de indivíduos com processo inflamatório leve (mucosa oral) e provenientes de tireidectomia (Linfonodos), sem correlação com a PCM.	71
Figura 4.21	Análise por imuno-histoquímica da expressão de IL12p70 em lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com PCM em comparação com cortes histológicos de indivíduos com processo inflamatório leve (mucosa oral) e provenientes de tireidectomia (Linfonodos), sem correlação com a PCM.	73
Figura 4.22	Análise por imuno-histoquímica da expressão de IL-23 em lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com PCM em comparação com cortes histológicos de indivíduos com processo inflamatório leve (mucosa oral) e provenientes de tireidectomia (Linfonodos), sem correlação com a PCM.	75
Figura 4.23	Análise por imuno-histoquímica da expressão de IL-10 em lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com PCM em comparação com cortes histológicos de indivíduos com processo inflamatório leve (mucosa oral) e provenientes de tireidectomia (Linfonodos), sem correlação com a PCM.	77
Figura 4.24	Análise por imuno-histoquímica da expressão de CD206 em lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com PCM em comparação com cortes histológicos de indivíduos com processo inflamatório leve (mucosa oral) e provenientes de tireidectomia (Linfonodos), sem correlação com a PCM.	79
Figura 4.25	Análise por imuno-histoquímica da expressão de iNOS em lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com PCM em comparação com cortes histológicos de indivíduos com processo inflamatório leve (mucosa oral) e provenientes de tireidectomia (Linfonodos), sem correlação com a PCM.	80
Figura 4.26	Análise por imuno-histoquímica da expressão de MMP1 em lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com PCM em comparação com cortes histológicos de indivíduos com processo inflamatório leve (mucosa oral) e provenientes de tireidectomia (Linfonodos), sem	82

Figura 4.27	correlação com a PCM. Análise por imuno-histoquímica da expressão de MMP2 em lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com PCM em comparação com cortes histológicos de indivíduos com processo inflamatório leve (mucosa oral) e provenientes de tireidectomia (Linfonodos), sem correlação com a PCM.	83
Figura 4.28	Análise por imuno-histoquímica da expressão de MMP3 em lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com PCM em comparação com cortes histológicos de indivíduos com processo inflamatório leve (mucosa oral) e provenientes de tireidectomia (Linfonodos), sem correlação com a PCM.	84
Figura 4.29	Análise por imuno-histoquímica da expressão de MMP9 em lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com PCM em comparação com cortes histológicos de indivíduos com processo inflamatório leve (mucosa oral) e provenientes de tireidectomia (Linfonodos), sem correlação com a PCM.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA: Soro albumina bovina
- CLRs: receptores C-lectina
- CFA: Cell Free Antigen – Antígeno livre da célula
- cAg: Antígeno celular
- CMSP: Células mononucleares do sangue periférico
- ELISA: Ensaio Imunoenzimático
- FA: Forma Aguda (juvenil) da Paracoccidiodomicose
- FC: Forma Crônica (adulta) da Paracoccidiodomicose
- GATA 3: Fator de transcrição expresso em células T Helper 2.
- GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
- Gp43: glicoproteína de 43kDa
- H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
- Ig: Imunoglobulina
- IHQ: Imunohistoquímica
- IL-: Interleucina
- IFN-γ: Intereferon gamma
- MΦ: Macrófagos
- MR: Receptor de manose
- PAMPs: Padrões moleculares associados à patógenos
- PMA: Phorbol-12-miristato-13-acetato
- Pb18: cepa de alta virulência do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*
- PRRs: Receptores de reconhecimento padrão
- PCM: Paracoccidiodomicose
- SBF: Soro fetal bovino
- T-bet: Fator de transcrição expresso em células T Helper 1
- TGF- β: Transforming Growth Factor β – Fator de crescimento transformador
- THT – Teste de hipersensibilidade do tipo tardio
- Th: Linfócitos T auxiliar (“helper”)
- TLRs: Receptores do tipo Toll (Toll-like receptors)
- TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa
- T reg: T regulatórias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Casuística	28
3.2. Obtenção de células mononucleares (CMNs) do sangue periférico e obtenção de células CD14 ⁺ (monócitos) e células CD3 ⁺ (linfócitos T) por separação imunomagnética	30
3.3. Diferenciação de macrófagos M1 e M2 a partir de células CD14 ⁺	30
3.4. Obtenção de leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	33
3.5. Análise fenotípica de macrófagos M1 e M2 por estimulados com <i>P. Brasiliensis</i>	33
3.5.1. Análise da produção de IL-6, TNF- α , IL12p70, IL-10, TGF- β , IL-1 β , IL-23, IL-37, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10 e CCL-5 por macrófagos M1 e M2	34
3.6. Avaliação da formação de granuloma <i>in vitro</i>	35
3.6.1. Obtenção do antígeno livre de células (CFA), do antígeno celular (cAg) e da gp43	35
3.6.2. Preparo das esferas de poliacrilamida com antígenos (CFA, cAg, Gp43 e PPD).....	36
3.6.3. ELISA das esferas recobertas com antígenos (CFA, cAg e gp43).....	36
3.6.4. Culturas de macrófagos com "beads" recobertas com antígenos para avaliação da formação de granuloma <i>in vitro</i>	37
3.7. Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos M1 e M2	39
3.8. Determinação da capacidade fungicida de macrófagos.....	40
3.9. Determinação da produção de H ₂ O ₂ e Oxido nítrico (NO) por Macrófagos M1 e M2.....	41
3.10. Avaliação da atividade de Arginase I	42
3.11. Avaliação da diferenciação de linfócitos T CD3 ⁺ cocultivados com macrófagos M1 ou M2	42
3.11.1. Citometria de fluxo de linfócitos T cocultivados com Macrófagos M1 e M2.....	43

3.12. Imuno-histoquímica de lesões de mucosa oral e linfonodos de pacientes com PCM	44
3.13. Avaliação das reações de IHQ.....	46
3.14. Análise estatística	46
4. RESULTADOS	47
4.1. Caracterização fenotípica de macrófagos M1 e M2 diferenciados in vitro a partir de monócitos do sangue periférico (células CD14 ⁺) ...	47
4.2. Análise da produção de citocinas, quimiocinas e metaloproteínas de matriz por macrófagos M1 e M2	52
4.3. Avaliação da formação de granuloma in vitro	56
4.4. Análise da capacidade fagocítica de células M1 e M2.....	57
4.5. Análise da atividade fungicida dos macrófagos M1 e M2 contra leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	61
4.6. Análise da produção de H ₂ O ₂ e NO pelos macrófagos M1 e M2.....	62
4.7. Avaliação da atividade de Arginase I	63
4.8. Avaliação da diferenciação de linfócitos T CD3 ⁺ cocultivados com macrófagos M1 ou M2.....	64
4.9. Análise por imuno-histoquímica de biópsias de pacientes com paracoccidiodomicose	66
5. DISCUSSÃO.....	86
6. CONCLUSÕES.....	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
8. APÊNDICE	105
8.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	105

1. INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica de maior incidência na América Latina [1, 2]. Até recentemente, *Paracoccidioides brasiliensis* era considerada a única espécie responsável pela PCM, entretanto estudos filogenéticos incluindo amostras clínicas e ambientais de países latino-americanos mostraram que o gênero *Paracoccidioides* representa um complexo formado por diferentes espécies filogenéticas crípticas: S1, PS3 e PS2 [3]. Tais espécies filogenéticas apresentam distribuição diferente, sendo S1 e PS2 encontrados no Brasil, Argentina, Peru, Paraguai e Venezuela, enquanto a PS3 restrito a Colômbia [4]. Em 2009, Teixeira et al. caracterizaram 17 novos isolados, revelando uma quarta espécie críptica do fungo (Pb01) *Paracoccidioides lutzii*, sendo 16 isolados na região central do Brasil e 1 no Equador [1, 5].

O *P. brasiliensis* se desenvolve na forma de micélio à temperatura ambiente (22-25°C), enquanto que em temperaturas mais elevadas (35-37°C) apresenta-se na forma de levedura, caracterizada por um aspecto semelhante “roda-de-leme”, com brotamentos menores e mais jovens ligados à célula mãe. Esta característica morfológica é de grande importância na taxonomia e diagnóstico do patógeno [6].

Células de *P. brasiliensis* apresentam em sua parede uma variedade de componentes: polissacarídeos como quitina, polímeros de glicose, proteínas e lipídios. Esta composição pode variar de acordo com sua fase morfológica, sabe-se que a quitina está presente tanto na fase micelina quanto na leveduriforme. Já a α -1,3-glucana, pode ser encontrada na parede celular durante a fase leveduriforme (95%), enquanto que a β -1,3-glucana apresenta predomínio na forma miceliana [7]. Além de apresentarem diferenças em sua composição estrutural, as várias cepas do *P. brasiliensis* também produzem quantidades variáveis de antígenos. Dentre os antígenos, a glicoproteína de 43kDa (gp43) é considerada a de maior valor diagnóstico, uma vez que a sorologia mostra-se 100% positiva para este antígeno em pacientes com PCM, e sua presença no soro de indivíduos infectados com o fungo, tem um importante papel como marcador da eficácia terapêutica [8].

A infecção se dá quando os indivíduos inalam conídios produzidos pela forma miceliana do fungo, e uma vez dentro do organismo do hospedeiro ocorre a conversão dos conídios em leveduras que podem permanecer nos pulmões ou disseminar-se via sistema hemato-linfático para outros órgãos e tecidos [2, 9].

Como resultado da infecção inicial pode desenvolver-se a forma subclínica da doença, denominada paracoccidioidomicose-infecção (PCM-infecção), que é assintomática e evidenciada somente pela pesquisa com o teste de hipersensibilidade tardia (HTT) a antígenos derivados do fungo. Após seu estabelecimento, a doença se caracteriza por apresentar um largo espectro de manifestações clínicas, agrupadas em 2 formas principais: a forma adulta ou crônica (FC), geralmente mais localizada e menos agressiva e a forma juvenil ou aguda (FA), mais grave e disseminada [2]. Em ambos os casos a imunidade celular apresenta-se comprometida, e a ausência de intervenção por meio de terapia específica leva a altas taxas de mortalidade, principalmente em crianças [2, 10], podendo ser considerada a oitava causa de mortalidade por doença infecciosa/parasitária predominantemente crônica, superando a mortalidade causada pelas leishmanioses [2].

Com a finalidade de melhor caracterizar e compreender a resposta imunológica desencadeada durante a paracoccidioidomicose humana, estudos com modelos animais da doença foram desenvolvidos. Camundongos suscetíveis (linhagem B10.A) apresentam resposta imune celular deprimida, evidenciada pela proliferação de linfócitos e reação de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) diminuídas frente a estímulos com antígenos do fungo [11, 12]. Além disso, produzem preferencialmente citocinas do tipo Th2 como IL-4, IL-5 e IL-10 [12, 13]. Por outro lado, nos camundongos resistentes (linhagem A/Sn – A/J) a resposta imunológica celular é preservada, com linfoproliferação e testes de HTT positivos e produção de citocinas do tipo Th1 como o IFN- γ e o TNF- α [12, 13].

As características da resposta imunológica adaptativa observadas em modelos experimentais na PCM apresentam semelhanças na doença humana. Estudos revelam que as formas crônica e aguda da PCM apresentam respostas imunológicas distintas. Indivíduos apresentando a FA apresentam uma resposta predominantemente Th2/Th9, com produção aumentada (*in vitro*) de citocinas supressoras da resposta imune celular como a IL-4, IL-5, IL-10, o fator de transformação de crescimento-beta (TGF- β), IL-9 e baixa produção de IFN- γ e TNF- α [14-19]. Os indivíduos com a FC desenvolvem uma resposta mista, que resulta em diferentes apresentações clínicas da doença, produzindo citocinas do tipo Th1 e Th17 como IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17 e IL-22 e quantidades variáveis de IL-10 e IL-4

[16-19]. Já os indivíduos apresentando a PCM-infecção não apresentam sinais clínicos de doença e tampouco produzem anticorpos específicos, mas desenvolvem resposta celular vigorosa contra antígenos do fungo e produzem quantidades elevadas de IFN- γ , IL-2 e TNF- α e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 [16-19].

A diferenciação de células T nas diversas subpopulações é regulada principalmente pela presença de certas citocinas produzidas no ambiente onde ocorre a apresentação do antígeno, a interação dessas citocinas com seus receptores leva a sinalização intracelular específica, e posterior ativação de fatores de transcrição que são característicos de cada uma dessas subpopulações [20, 21]. Assim, células Th1 se diferenciam quando citocinas como a IL-12 e IFN- γ estão presentes no meio, os quais levam a ativação de fatores de transcrição como a STAT-1, STAT-4 e T-bet. As células Th2 se diferenciam na presença de IL-4, que sinaliza via STAT-6 e GATA-3 [20-22]. De maneira geral as células Th17 se diferenciam na presença de TGF- β e IL-6, sendo que outras citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α podem ter efeitos adicionais [21, 23, 24]. Além dessas citocinas, também é importante a presença de IL-23 que promove a sobrevivência e a diferenciação adicional dessas células. A diferenciação de células Th17 ocorre por meio da sinalização via STAT-3 e ROR γ t [25].

Embora os fatores relacionados à resposta imunológica adaptativa que levam à resistência ou suscetibilidade às infecções fúngicas estejam relativamente bem estabelecidos, ainda existem diversas questões sobre como essas respostas são induzidas [26]. Por esse motivo, nos últimos anos, a resposta imunológica inata passou a ser bastante estudada [27]. Essa é desencadeada durante o contato inicial entre o patógeno e as células do hospedeiro, que desempenham um papel de extrema importância para o desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa subsequente. Dentre as células do sistema imunológico inato, os macrófagos são extremamente importantes para o reconhecimento, eliminação e determinação da resposta imune adaptativa em diversas infecções fúngicas [26, 28].

Na candidíase, causada por *Candida albicans*, os macrófagos controlam a doença através da eliminação do fungo, induzindo o desenvolvimento de resposta do tipo Th1 [29, 30]. Na criptococose os macrófagos parecem desempenhar um papel deletério visto que, embora sejam capazes de fagocitar o fungo, este é por sua vez capaz de sair das células e desta forma se disseminar. Foi observado também

que animais depletados de macrófagos apresentavam sobrevida maior que os animais controle [31]. Na aspergilose, causada por *Aspergillus fumigatus* a fagocitose por macrófagos alveolares auxilia na remoção do fungo evitando a disseminação [32]. Na paracoccidiodomicose, após sua entrada nos pulmões, o fungo provavelmente reconhecido por macrófagos alveolares através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como os receptores do tipo Toll (TLRs), dectina-1 e receptor de manose [33]. Alguns trabalhos demonstram que existe a necessidade de ativação, para que os macrófagos desempenhem um papel protetor [34-36]. Uma vez ativados por citocinas como o TNF- α e o IFN- γ os macrófagos produzem moléculas como os reativos intermediários de oxigênio (RIOs) e óxido nítrico (NO) que auxiliam na eliminação o fungo. Além disso, essas células processam e apresentam antígenos e produzem citocinas que ativam outras células do sistema imune. Por outro lado, macrófagos não ativados permitem a multiplicação das células fúngicas, levando a lesões teciduais e disseminação da doença [37].

A ativação dos macrófagos, como mencionado, baseia-se no reconhecimento de estruturas moleculares conservadas encontradas em inúmeros grupos de microrganismos, os PAMPS (padrões moleculares associados à patógenos), que são reconhecidos pelos PRRs como os receptores de manose (MRs), receptores de complemento (CRs), Lectinas do Tipo C (dectina-1) e os TLRs, capazes de iniciar a fagocitose e ativar a via pro-inflamatória [26, 38].

Os TLRs constituem um dos grupos mais importantes de proteínas transmembrana capazes de interagir com patógenos. Pelo menos 11 membros desta família foram descritos em humanos [39]. A ativação dos TLRs resulta na produção de vários mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios que regulam a resposta imune adaptativa [38].

O TLR4 reconhece lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas (LPS) enquanto que o TLR2 está envolvido na interação com lipoproteínas de bactérias gram-positivas, peptidoglicanos e componentes de parede celular de fungos [33, 38]. Estudos posteriores também atribuíram ao TLR2 a indução de uma resposta imune anti-inflamatória no hospedeiro [40].

Leveduras do *P. brasiliensis* são capazes de ativar TLR2 e TLR-4 de macrófagos, causando o aumento da sua atividade fagocítica e produção de óxido nítrico [41]. Paradoxalmente, foi observado que camundongos TLR2^{-/-} com infecção pulmonar crônica pelo *P. brasiliensis* apresentam uma doença mais controlada e

menos grave que animais selvagens, com diminuição do número de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados, aumento do número de neutrófilos, diminuição da produção de citocinas Th1 e Th2 e produção de TGF- β , IL-6, IL-23 e IL-17. Nestes animais o desenvolvimento preferencial de uma resposta Th17 foi associado a uma diminuição do número de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e controle mais efetivo da doença [42]. Em outro trabalho os mesmos autores verificaram que camundongos C3H/HeJ, que são naturalmente deficientes na via de sinalização do TLR4, não são capazes de controlar a infecção pulmonar pelo *P. brasiliensis*, o que estaria associado a uma resposta imune celular deficiente e aumento da população de células T regulatórias, comparado a animais C3H/HePas que expressam receptores funcionais [43].

Resultados de nosso grupo de pesquisa sugerem a participação do TLR2, TLR4 e Dectina-1 no reconhecimento e internalização do fungo por monócitos e neutrófilos humanos, e consequente ativação da resposta imunológica ao *P. brasiliensis* [44]. A dectina-1, um receptor tipo lectina C, reconhece moléculas de 1,3 β -glucanas, um dos principais componentes da parede celular de fungos patogênicos como *P. brasiliensis*, *C. albicans*, *A. fumigatus* e *Pneumocystis jirovecii* [45, 46]. A interação da Dectina-1 com seu ligante induz a fagocitose, produção de citocinas (TNF- α , IL-2, IL-10 e IL-12), produção de reativos intermediários do oxigênio e recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório para controle da proliferação fúngica [45, 46]. Alguns trabalhos sugerem que a Dectina-1 age em sinergismo com TLRs, promovendo uma resposta inflamatória exacerbada [47]. Camundongos deficientes em Dectina-1 são mais suscetíveis à infecção por *C. albicans* e *Pneumocystis jirovecii* [45].

Dessa forma, após ativados os macrófagos apresentam um papel central na inflamação e defesa do hospedeiro. Atualmente sabe-se que macrófagos representam uma população heterogênea de células, com uma variedade de funções participando tanto na indução quanto na resolução da inflamação [48]. Sua plasticidade têm sido evidenciada em diversos trabalhos, já que respondem a diversos estímulos de acordo com o microambiente em que estão presentes (produtos microbianos, restos celulares, linfócitos ativados). Com isso, adquirem aspectos funcionais flexíveis, sendo possível a classificação em fenótipos conhecidos como: M1 (ativados por via clássica) ou M2 (ativação alternativa) [48,

49]. Esta classificação apresenta semelhanças à polarização de linfócitos Th1 e Th2 respectivamente [48, 49].

Macrófagos M1 são induzidos na presença de IFN- γ sozinho, ou conjunto com estímulos microbianos (LPS), ou de fatores de crescimento como o GM-CSF e tem sua diferenciação inibida na presença de IL-4 e IL-13 [48, 50, 51]. Seu fenótipo é caracterizado pela alta expressão de CD11c, TLR2, TLR4, CCR7, MHC de classe II, CD80 e CD86. Macrófagos M1 produzem grandes quantidades de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias como IL-23, CCL2, CCL5, CXCL8, IL-1 β , TNF- α e IL-6 e apresentam baixa produção de IL-10 [48, 51, 52]. Também são caracterizados pela expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção de IL12, citocina associada a resposta Th1. De acordo com essas características, macrófagos M1 são células bem adaptadas na promoção de respostas imunes vigorosas e quando propriamente ativados, fagocitam e destroem micro-organismos, eliminam células tumorais e apresentam antígenos a células T. Tais eventos podem influenciar diretamente a qualidade e amplitude da resposta imune adaptativa [53, 54].

As células M2, por sua vez, são induzidas sob estímulo de M-CSF ou na presença de citocinas como a IL-4, IL-10, TGF- β e IL-13, imunocomplexo, glucocorticóides e vitamina D3. Dessa forma os macrófagos M2 também podem ser subcategorizados de acordo com as condições de diferenciação em: M2a (expostos a IL-4 e IL-13), M2b (diferenciados na presença de imuno complexos na combinação com IL-1 ou LPS) e M2c (diferenciados na presença de IL-10, TGF- β ou glucorticoides) [48]. Fenotipicamente, os macrófagos M2 apresentam em sua superfície as moléculas CD206 (receptor para manose), CD301, CD163 e baixa expressão de MHC de classe II, CD80 e CD86. Esses macrófagos produzem pouca IL-12 e IL-23, mas apresentam alta produção de IL-10 e de arginase-1. São capazes de promover a resposta Th2, suprimir respostas Th1, além de atuar em respostas contra parasitas. [48, 51, 52]. Macrófagos do tipo M2, também são comumente encontrados em tumores [55], sabe-se que citocinas anti-inflamatórias provenientes de ambientes tumorais como a IL-4, IL-10 e IL-13, além outros mediadores como o TGF- β e prostaglandinas E2 (PGE2), promovem a polarização do tipo M2. Nesse ambiente, os macrófagos M2 são denominados de TAMs ("Tumor associated

macrophages" – macrófagos associados a tumores), com participação tanto nos processos iniciais, como no desenvolvimento e crescimento dos tumores [56].

O desequilíbrio entre as duas populações pode ser associado a várias patologias. Em algumas doenças infecciosas, como as causadas por micobactérias, estudos apontam para a participação de macrófagos M1 na promoção da resistência e na formação de granulomas e, conseqüentemente na contenção da doença [57]. Enquanto que macrófagos M1 parecem ser essenciais para a formação dessas estruturas, a presença de macrófagos M2 inibem a sua formação [58]. Na forma mais grave da hanseníase (forma lepromatosa), as lesões de pacientes são caracterizadas pela presença de grande número de macrófagos M2, associados com o predomínio de resposta Th2. Enquanto que na forma mais branda da doença (forma tuberculoide) existe a formação de granulomas compactos, com predomínio de macrófagos M1, associados com uma resposta Th1 protetora [57].

Na PCM, estudos com modelos experimentais demonstram que durante a resposta imune inata, macrófagos alveolares de camundongos susceptíveis exibem um controle melhor do crescimento do *P. brasiliensis*, quando comparados aos macrófagos de camundongos resistentes. Porém em estágios posteriores da resposta, apenas camundongos resistentes conseguem controlar o crescimento fúngico, sendo essa característica associada a uma robusta resposta nos testes de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) e aumento da secreção de IFN γ [59]. Estudos mais recentes mostraram que macrófagos de camundongos B10.A (suscetíveis) após serem infectados pelo *P. brasiliensis* e expostos a mananas (presente na camada externa da parede do *P. brasiliensis*) apresentam características de M1 (secreção de IL-12), e que após estímulo com IFN- γ exibem eficiente atividade fungicida e produção elevada de NO. Por outro lado macrófagos provenientes de camundongos resistentes (A/J) exibem um perfil M2, com elevada expressão de RNAm para Arginase-1, sendo que com o bloqueio do TLR4 e CR3 a produção de TNF- α foi inibida e IL-6 e IL-10 aumentada [60].

Dessa forma uma resposta inicial com caráter mais inflamatório parece ser prejudicial para o desenvolvimento de uma resposta protetora, levando a maior destruição tecidual e subsequente desenvolvimento de resposta adaptativa envolvida na suscetibilidade à doença. A destruição tecidual observada na resposta inflamatória, envolve além da produção de citocinas, o balanço entre a síntese e a

quebra de componentes da matriz extracelular com a participação de enzimas que degradam essas proteínas, dentre elas as metaloproteinases de matriz (MMPs) [61]. Poucos são os trabalhos que investigaram se macrófagos M1 e M2 apresentam padrões distintos de produção de MMPs. Mas aparentemente, macrófagos M1 produzem maiores quantidades dessas enzimas durante a ativação, enquanto que macrófagos M2 produzem mais de seus inibidores [62, 63]. Não existem muitos estudos sobre o papel das MMPs em doenças causadas por fungos. Na infecção experimental por *C. neoformans* observou-se que a expressão e produção de MMP-2 pode ser associada à formação de granulomas em resposta ao patógeno [64]. No modelo experimental da PCM foi demonstrado que a infecção leva a um aumento da produção de MMP-9 e MMP-2 por células do infiltrado inflamatório, tanto em animais resistentes como em animais suscetíveis, sendo essa produção associada à disseminação do fungo [65].

Na PCM humana, ainda não existem trabalhos abordando a função das diferentes subpopulações de macrófagos. Porém, alguns indícios demonstram que as diferentes formas clínicas da doença (FC e FA) possam ser caracterizadas por populações distintas de macrófagos, como ocorre com a hanseníase. Pacientes com a FC da doença apresentam lesões com a presença de granulomas bem formados (compactos) e poucas células fúngicas. É interessante notar que os macrófagos e células gigantes presentes nessas lesões produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α [66], IL-12p70 e IL-23. Enquanto que nas lesões de pacientes com a FA os granulomas não se formam de maneira típica, mostrando-se frouxos, apresentando um grande número de células fúngicas. Além disso os macrófagos nas lesões desses pacientes produzem grandes quantidades de IL-10 [66]. Em um trabalho recente foi descrito que lesões de pacientes com PCM que apresentavam granulomas frouxos apresentam macrófagos expressando moléculas características de macrófagos M2 (CD163) [67].

Em trabalho anterior verificamos que macrófagos alveolares de pacientes com PCM pulmonar (FC) quando estimulados *in vitro* com LPS produzem concentrações elevadas de IL-6, TNF- α e MIP-1 α quando comparados a monócitos do sangue periférico [68]. Em um estudo publicado por Batista *et al.* (2005) foi descrito que macrófagos de lesões com poucos fungos e granulomas bem formados, podem ser caracterizados por produção de NO (detectada pela presença da enzima

iNOS), enquanto que lesões com grande número de fungos onde não ocorre a formação de granulomas, os macrófagos produzem pouco ou nenhum NO [69]. Popi *et al.* (2002) mostraram que a glicoproteína de 43kDa produzida pelo *P. brasiliensis* (gp43) inibe a produção de NO por macrófagos peritoniais de camundongos infectados pelo fungo [70].

O óxido nítrico é um reativo intermediário de nitrogênio produzido durante o catabolismo de L-arginina que ocorre pela ação de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintase, e constitui um importante agente microbicida. A produção de NO é controlada negativamente pela enzima arginase-1 (Arg1) que quebra a L-arginina em ornitina e uréia, removendo do meio a L-arginina necessária para a produção de NO [71]. Como mencionado anteriormente macrófagos M1 são caracterizados pela produção de NO, enquanto que macrófagos M2 são produtores de Arg-1[57].

Pelo exposto, fica claro que papel das subpopulações de macrófagos (M1 e M2) em infecções fúngicas ainda não foi determinado com clareza. Particularmente na PCM existem poucos estudos publicados, apesar de algumas evidências indicarem uma possível participação de populações de macrófagos com características distintas nas diferentes formas clínicas da doença. Essas diferentes populações de macrófagos poderiam contribuir para o desenvolvimento das distintas respostas adaptativas subsequentes que levariam à maior resistência ou maior suscetibilidade à doença, e que caracterizam as duas formas clínicas da paracoccidioidomicose.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o fenótipo e funções efetoras de populações de macrófagos M1 e M2 humanos em resposta ao fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar se macrófagos M1 e M2, diferenciados *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis, apresentam diferenças fenotípicas e funcionais frente a estímulos com leveduras ou antígenos de *P. brasiliensis*. Para isso foram avaliados os seguintes parâmetros:
 - Produção de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases após estímulo com leveduras de *P. brasiliensis* da cepa Pb18.
 - Produção de reativos intermediários de oxigênio (H_2O_2), NO e a atividade de arginase-1 após o estímulo com leveduras de *P. brasiliensis*.
 - Atividade fagocítica e fungicida em resposta à exposição a leveduras de *P. brasiliensis*.
 - Formação de granulomas (*in vitro*) em resposta a estímulos com antígenos derivados de *P. brasiliensis*.
 - Capacidade de apresentação de antígenos, ativação e da indução de diferenciação de linfócitos T em células Th1, Th2, Th17/Th22.
- Caracterizar fenotipicamente macrófagos em lesões de pacientes com as duas formas clínicas da paracoccidioidomicose, por meio de imuno-histoquímica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

Como se trata estudo de células do sistema inato, e que, portanto não necessitam de exposição prévia ao agente etiológico, foram utilizadas células obtidas do sangue periférico de indivíduos saudáveis (controles). O número de indivíduos utilizado nos grupos de experimentos está demonstrado em cada gráfico (cerca de 10 a 15 indivíduos para cada parâmetro avaliado). Cada indivíduo foi informado sobre sua participação na pesquisa, assinando um termo de consentimento pós-informação, de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Parecer # 1253/2011 - CAAE: 1156.0.146.000-11).

Para as reações de imuno-histoquímica foram utilizadas biópsias de lesões de mucosa (10 biópsias) ou linfonodos (10 biópsias) causadas pelo *P. brasiliensis*. Foram utilizados tecidos de biópsias obtidas para fim diagnóstico, fixados e embebidos em parafina e armazenadas no arquivo de blocos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, em um período que compreende os últimos 2 anos. Também incluímos a análise de 2 amostras de tecidos de mucosa-oral provenientes de pacientes com diagnóstico de processo inflamatório leve sem relação a PCM e 2 amostras de linfonodos provenientes de pacientes com câncer de tireoide sem sinais de alteração patológica (inflamação ou neoplasia).

Delineamento experimental

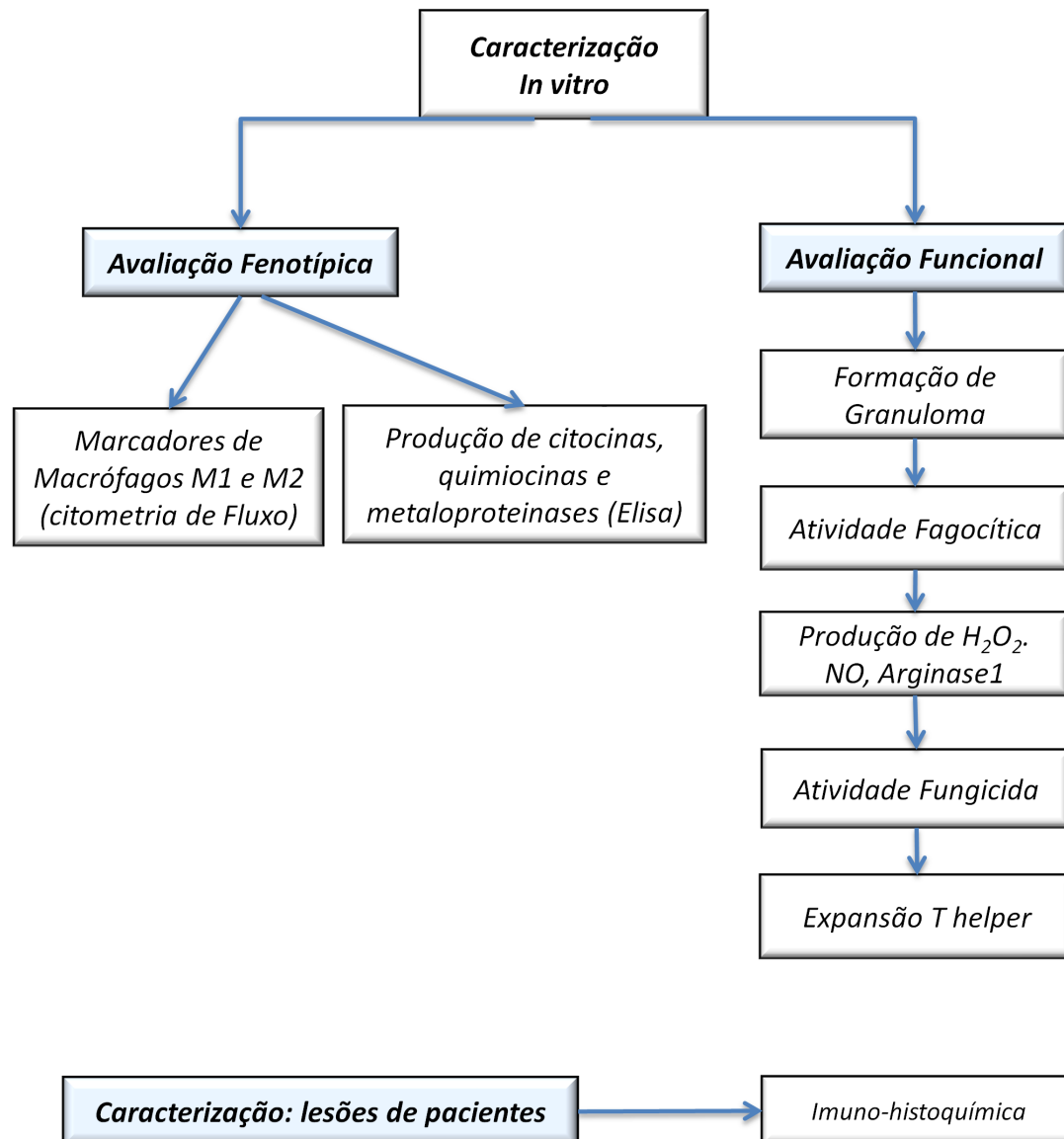


Figura 3.1: Delineamento experimental: Células CD14⁺ foram diferenciadas *in vitro* em macrófagos M1 e M2 e posteriormente avaliadas quanto aos seus fenótipos e funções quando cultivadas na presença de leveduras do *P. Brasiliensis*. Caracterização de marcadores associados a macrófagos M1 e M2 em lesões de pacientes.

3.2. Obtenção de células mononucleares (CMNs) do sangue periférico e obtenção de células CD14⁺ (monócitos) e células CD3⁺ (linfócitos T) por separação imunomagnética

O sangue periférico dos doadores saudáveis foi coletado (80 mL) em tubos contendo heparina sódica. Após a coleta, o sangue foi transferido para tubos contendo uma solução de Ficoll-hypaque (densidade 1,077) e centrifugado a 800 g durante 30 minutos à temperatura ambiente. A fração contendo as CMSP foi coletada e submetida a duas lavagens com SST (300 g, por 10 minutos a 4°C). Após as lavagens, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco – Life Technologies) suplementado com soro bovino fetal (SBF-10% - Gibco), L-glutamina, Piruvato de Sódio e gentamicina (todos Gibco), contadas em câmara de Neubauer, e utilizadas para a realização de diferentes experimentos, descritos a seguir.

O isolamento de monócitos (células CD14⁺) foi feito por meio de separação imunomagnética. As CMSP foram submetidas à separação positiva por meio da incubação com anticorpos acoplados a esferas magnéticas (anti-CD14 - MACS, Miltenyi Biotec) seguindo as instruções do fabricante. Para alguns experimentos, foram separadas as células T CD3⁺ através da incubação com anticorpos anti-CD3 acoplados a esferas magnéticas (CD3MicroBeads - MACS - Miltenyi Biotec), conforme as instruções do fabricante. A pureza das células foi avaliada por meio de citometria de fluxo, sendo >95%.

3.3. Diferenciação de macrófagos M1 e M2 a partir de células CD14⁺

Após sua obtenção, as células CD14⁺, ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado (soro bovino fetal a 10%, inativado, L-glutamina a 2mM e gentamicina a 5 µg/mL) para a concentração de 2 x 10⁶ células/mL e colocadas em placas de cultura de 6 poços (1mL/poço). Para a diferenciação dos macrófagos M1 as células foram incubadas com 50ng/mL de GM-CSF recombinante. Para diferenciação de macrófagos M2 as células foram incubadas com 100 ng/mL de M-CSF [72]. As células foram mantidas em cultura por 5 dias, sendo que as citocinas recombinantes foram adicionadas no início da cultura e após 48 horas.

Para verificar se as condições de cultura utilizadas neste trabalho foram suficientes para a diferenciação de macrófagos nas subpopulações M1 e M2, ao final do cultivo, amostras foram retiradas para avaliação fenotípica por citometria de

fluxo. Para isso analisamos alguns marcadores característicos de macrófagos M1 e M2 como: CD14, CD68, CD1a, CD163, CD206, CD80, CD86, MHCII.

Como pode ser observado na figura abaixo (figura 3.2), as condições de cultura testadas levaram à diferenciação de macrófagos com as características descritas na literatura para as duas subpopulações de macrófagos [49, 72]. É possível observar que as duas populações de macrófagos aumentam a expressão do marcador CD68, em comparação aos monócitos. A população de macrófagos M1 apresenta menor expressão das moléculas CD14, CD206 e CD163, em comparação com os macrófagos M2. Já a população M2 apresenta menor expressão de CD1a, MHC de classe II, CD80 e CD86 quando comparada a macrófagos M1.

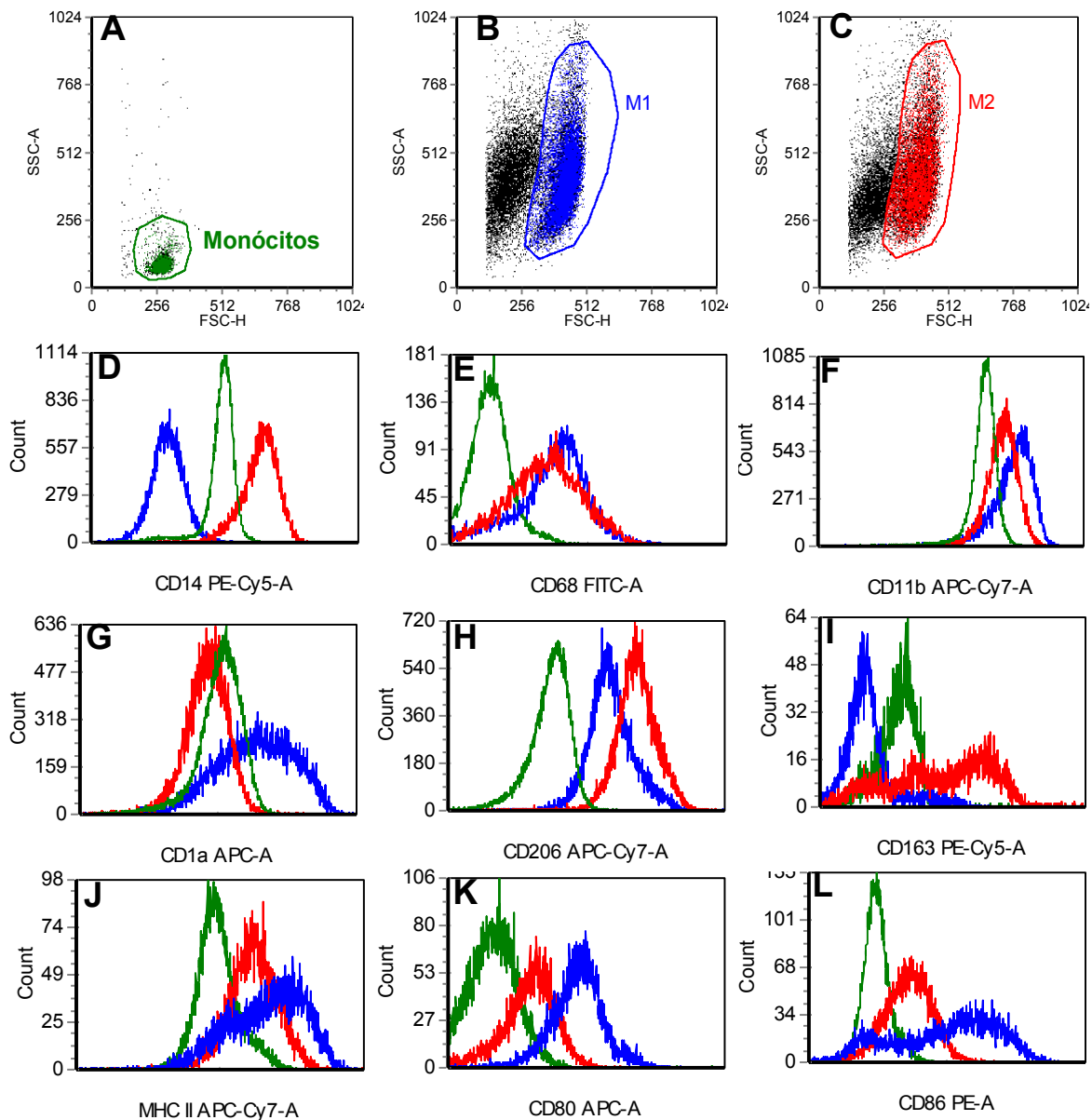


Figura 3.2: Análise por citometria de fluxo do fenótipo de células CD14⁺ submetidas às condições de cultura para diferenciação de macrófagos em M1 e M2. **A-C:** “Dot-plots” representativos da análise por citometria de fluxo da distribuição por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) de monócitos do sangue periférico antes (**A**) e depois de 5 dias de cultura com GM-CSF (M1 - **B**) e M-CSF (M2 - **C**). **D-L:** Histogramas representativos da marcação de superfície com anticorpos anti-CD14 (**D**), anti-CD68 (**E**), anti-CD11b (**F**), anti-CD1a (**G**), anti-CD206 (**H**), anti-CD163 (**I**), anti-MHC de classe II (**J**), anti-CD80 (**K**) e anti-CD86 (**L**). Os histogramas foram gerados a partir dos gates destacados nos “dot-plots” (monócitos - em verde; M1 - em azul e M2 - em vermelho).

3.4. Obtenção de leveduras de *P. brasiliensis*

Culturas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* da cepa virulenta Pb18 foram mantidas a 36°C em meio Fava-Netto por 5 dias. Após esse período, as leveduras foram coletadas pela lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. Para a obtenção de células individuais, a suspensão de leveduras foi submetida à agitação em vórtex em tubos contendo esferas de vidro de 4mm por 30 segundos (processo repetido 3 vezes). Após a dissolução dos grumos, os tubos foram deixados em repouso a 37°C por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, então realizou-se a contagem em câmara de Neubauer na presença de Azul de Tripán. Foram utilizadas suspensões contendo mais que 85% de fungos viáveis. O número de leveduras utilizado em cada experimento foi acertado conforme a necessidade.

3.5. Análise fenotípica de macrófagos M1 e M2 por estimulados com *P. Brasiliensis*

Para avaliarmos o fenótipo dos macrófagos M1 e M2, após 5 dias de diferenciação as células foram mantidas sem estímulo adicional ou estimuladas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* da cepa virulenta Pb18 (razão 1:1) por 4 e 24 horas. Após a incubação, os sobrenadantes das foram removidos e estocados a 80°C para análise imunoenzimáticas. As monocamadas de macrófagos foram lavadas com PBS para remoção de partículas de leveduras remanescentes e a seguir mantidas em PBS gelado por 15 minutos. As células foram removidas gentilmente com a ajuda de "cell scraper" e transferidas para placas de microtitulação (aproximadamente 2×10^5 células) contendo a mistura de anticorpos para a marcação de superfície: anti-CD14, anti-CD16, anti-CD11b, anti-CD80, anti-CD86, anti-HLA-DR, anti-MHCI, anti-CD163, anti-CD36, anti-CD206, anti-CD205, anti-CD209 (todos Biolegend) marcados com FITC, PE, PercP, APC, APC-Cy7 diluídos em 20µL de PBS-BSA(0,1%)-azida sódica (2mM) (PBS-B-A), seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação, as placas foram centrifugadas (300 g por 10 minutos a 4°C), o sobrenadante descartado e adicionado 200 µL do tampão PBS-B-A seguido de centrifugação. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas (vórtex) e adicionado 200 µL de formaldeído a 2% em PBS a cada cavidade, incubou-se por 20 minutos à temperatura ambiente. Após nova

centrifugação as células foram ressuspensas e adicionado 200 µL de tampão de permeabilização (PBS – BSA (0,1%) –Saponina (0,5%)) com incubação da placa por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram novamente centrifugadas e após o descarte do sobrenadante, foram ressuspensas com a mistura de anticorpos: anti-CD68 marcado com FITC diluído em 50µL de tampão de permeabilização, sendo em seguida submetidas à incubação em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados a cada cavidade 150 µL de tampão de permeabilização e a placa foi centrifugada (300 g por 10 minutos a 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas (vórtex) e adicionado 200 µL de tampão PBS-BSA. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 300 µL de formaldeído a 2%, transferidas para tubos de microtitulação e analisadas em citômetro de fluxo (FACScanto – Beckton & Dickinson), por meio de software específico (Diva – Beckton & Dickinson). As leituras foram realizadas em um intervalo máximo de 24 horas e os resultados expressos em porcentagem de células positivas e/ou intensidade média de fluorescência.

3.5.1. Análise da produção de IL-6, TNF- α , IL12p70, IL-10, TGF- β , IL-1 β , IL-23, IL-37, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10 e CCL-5 por macrófagos M1 e M2

Para a análise da produção de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases de matriz nos sobrenadantes de cultura, após a diferenciação os macrófagos M1 ou M2 foram mantidos sem estímulo adicional ou estimulados com leveduras do *P. brasiliensis* (Pb18 - razão 1:1) por 4 e 24 horas. Após esse período os sobrenadantes foram coletados e analisados para a presença de IL-6, TNF- α , IL12p70, IL-10, TGF- β , IL-1 β , IL-23, IL-37, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10 e CCL-5 por meio de ELISA ("kits" DuoSet - R&D Systems) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6. Avaliação da formação de granuloma *in vitro*

3.6.1. Obtenção do antígeno livre de células (CFA), do antígeno celular (cAg) e da gp43

O preparo dos antígenos da cepa Pb18 do *P. brasiliensis* foi realizado segundo Camargo et al. (1991) [73], com algumas modificações. Para a obtenção do antígeno celular ("cellular antigen" - cAg) e do antígeno livre de células ("cell free antigen" - CFA); células leveduriformes (cepa Pb18) obtidas após 7 dias de crescimento em meio Fava-Neto foram coletadas por meio de lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS - aproximadamente 15 mL) contendo inibidores de protease (Protease Inhibitor Cocktail – Sigma) e phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) a 100 µg/mL). A suspensão de células foi transferida para um tubo de 50 mL, homogeneizada em vórtex, e centrifugadas (1000 g a 4°C por 15 minutos). O sobrenadante contendo as proteínas liberadas (CFA) foi coletado e filtrado (0,22 µm) em condições estéreis, aliquotado e mantido a -80°C até dosagem do conteúdo de proteínas. O precipitado de células foi utilizado para a preparação do antígeno celular. Para isso, ao precipitado foi adicionado PBS suplementado com inibidores de protease (15 mL) seguido de homogeneização em banho de gelo, com homogeneizador de tecidos (por 1 minuto). Após a homogeneização a solução foi sonicada em banho de gelo (3 ciclos de 1 minuto, com intervalo de 1 minuto) e incubadas por uma noite a 4°C, sob agitação lenta e contínua. A mistura foi então centrifugada a 10.000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi dialisado por 48h a 4°C contra tampão Tris-HCl 0.02M (pH 8.1) com 8 trocas de tampão. Após a dialise, a preparação antigênica foi filtrada, aliquotada e mantida a -80°C até a dosagem do conteúdo proteico. A gp43 foi gentilmente cedida pelo professor Zoilo Pires Camargo.

A dosagem de proteínas nas preparações de antígenos (CFA, cAg e gp43) foi realizada utilizando-se o método de BCA ("BCA Assay Kit" - Bioagence), conforme instruções do fabricante.

3.6.2. Preparo das esferas de poliacrilamida com antígenos (CFA, cAg, Gp43 e PPD)

A conjugação das esferas de poliacrilamida com antígenos foi realizada segundo Doughty et al. (1987) [74]. Cerca de 200mg de esferas de poliacrilamida (Bio-Gel P-4 Gel - BioRad) foram adicionadas a 4 tubos de 15mL, sendo adicionado 10mL/tubo de tampão citrato pH 5,5. As esferas foram então autoclavadas e centrifugadas, sendo o sobrenadante descartado. Foram então realizadas 3 lavagens com tampão bicarbonato 0,5M. Após as lavagens as esferas foram incubadas por 4 horas a 63°C em banho-maria sob leve agitação, após o qual foram novamente centrifugadas e lavadas por 3 vezes com água MilliQ estéril. Feito isso, os tubos foram centrifugados novamente, em seguida, em cada tubo foi adicionado 10mg de cada antígeno isoladamente (CFA, cAg ou gp43) ou PPD de *Mycobacterium tuberculosis* (Connaught Laboratories, Canada.), 500 µl de solução EDAC (1-etil 3-(3)dimetilaminopropilcarbodimida - Sigma - 50mg/tubo) e água MilliQ autoclavada até completar um volume final de 50mL. As esferas foram incubadas sob agitação constante a 4°C por 24 horas, sendo então lavadas com PBS e ressuspensas em PBS contendo 0,01% de azida sódica. As esferas recobertas com os antígenos foram contadas em câmara de Neubauer, para se determinar o número de esfera por mL de cada preparação.

3.6.3. ELISA das esferas recobertas com antígenos (CFA, cAg e gp43)

Para averiguar se a cobertura das esferas com os antígenos foi efetivo, realizamos um teste imunoenzimático. Para isso, cerca de 600µl da suspensão de cada esfera recoberta com antígeno (CFA, cAg e gp43) (descrito acima) foram divididos em 6 tubos de diluição, 100µL/tubo de 2,5mL, totalizando 18 tubos finais. Em seguida esses tubos foram centrifugados (300 g por 10 minutos). Após a centrifugação, os sobrenadantes foram retirados e as suspensões de esferas foram incubadas por 1 hora com tampão (PBS+Leite desnatado a 5%+Tween 20 a 0,1%) PBS-L-T. Após a incubação, as esferas foram centrifugadas novamente e feita uma lavagem com (PBS+Tween20 a 0,1%) PBS-T. Após a lavagem as esferas foram incubadas por 1 hora com: Tubo 1 - um "pool" de soros de pacientes com paracoccidiodomicose; tubo 2 - com um "pool" de soros de indivíduos saudáveis; tubo 3 - somente o tampão de diluição (os testes foram realizados em triplicata). Os soros foram diluídos a 1:50 em PBS+Gelatina a 0,1% +Tween20 a 0,1%) PBS-G-T.

Após a incubação, os tubos foram lavados por 3 vezes (PBS-T) e incubados por 1 hora com anticorpo anti-IgG humana conjugada a peroxidase (Sigma) diluído 1/2000 em PBS-G-T. Após a incubação e 3 novas lavagens os tubos foram incubados com uma solução de substrato/cromógeno (Tampão acetato, TMB e H₂O₂) por 15 minutos. A reação foi parada com H₂SO₄ e o conteúdo de cada tubo foi transferido para placas de ELISA, e a leitura foi feita em equipamento específico a 450nm.

Os resultados mostraram que a preparação das esferas foi eficiente, sendo que obtivemos reações com valores elevados de absorbância somente com esferas recobertas com os antígenos (gp43, cAg ou CFA), utilizando o pool de soros de pacientes com paracoccidioidomicose (figura 3.3).

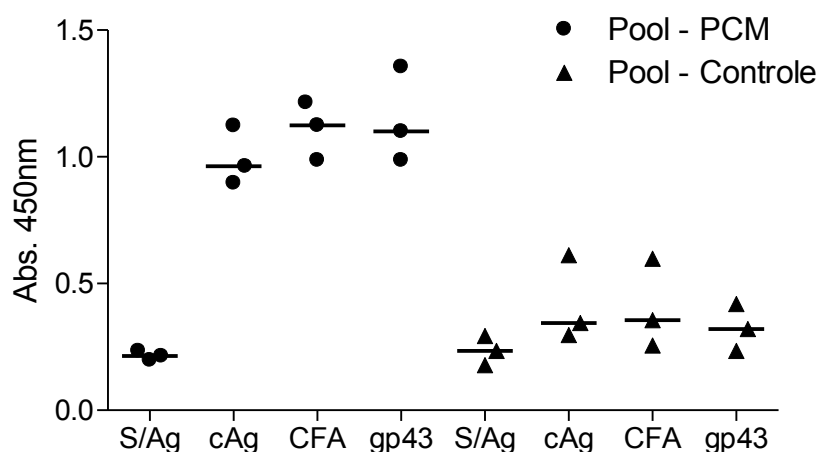


Figura 3.3: Resultados do ELISA para confirmação da cobertura das beads com antígenos derivados de *P. brasiliensis*. Foram testadas beads não recobertas (s/Ag) ou recobertas com antígeno celular de *P. brasiliensis* (cAg), antígeno livre de células (CFA) ou gp43. Os dados representam as absorbâncias a 450nm de cada uma das triplicatas testadas com o "pool" de soros de pacientes com PCM ou com o "pool" de soros de controles normais.

3.6.4. Culturas de macrófagos com "beads" recobertas com antígenos para avaliação da formação de granuloma in vitro

Macrófagos M1 ou M2 ($2,5 \times 10^5$), diferenciados conforme descrito acima, foram cocultivados com as esferas preparadas em placas de 24 poços. Cerca de 200 esferas de cada antígeno (cAg, CFA, gp43 e PPD) foram utilizadas por poço. Como controle positivo, utilizamos as esferas recobertas com PPD de *M. tuberculosis* (Connaught Laboratories, Canada). As culturas foram mantidas a 37°C

em estufa contendo 5% CO₂ durante um período de 15 dias. A partir do 3º dia foi determinada a formação de granulomas. Para tanto, foi utilizado um microscópio de contraste de fase (Nikon TMS). A avaliação foi feita de acordo com o tamanho do granuloma formado, os granulomas foram classificados por tamanho conforme descrito a seguir: 1) Ausência de células ligadas à esfera; 2) poucas células ligadas à esfera; 3) esferas com uma camada de células ao redor (pequeno); (4) esferas com múltiplas camadas de células ao redor (médio); (5) esferas com múltiplas camadas de células ao redor (grande). Foram contadas 100 esferas em cada poço de cultura e a média ponderada resultante de cada análise foi expressa como “índice de granuloma” (IG) de acordo com a equação abaixo, onde n é o número de granulomas de uma determinada classe (1 a 5):

$$G1 = \frac{(n1) \times 1 + (n2) \times 2 + (n3) \times 3 + (n4) \times 4 + (n5) \times 5}{100}$$

Na figura abaixo estão imagens representativas de granulomas formados *in vitro* (figura 3.4).

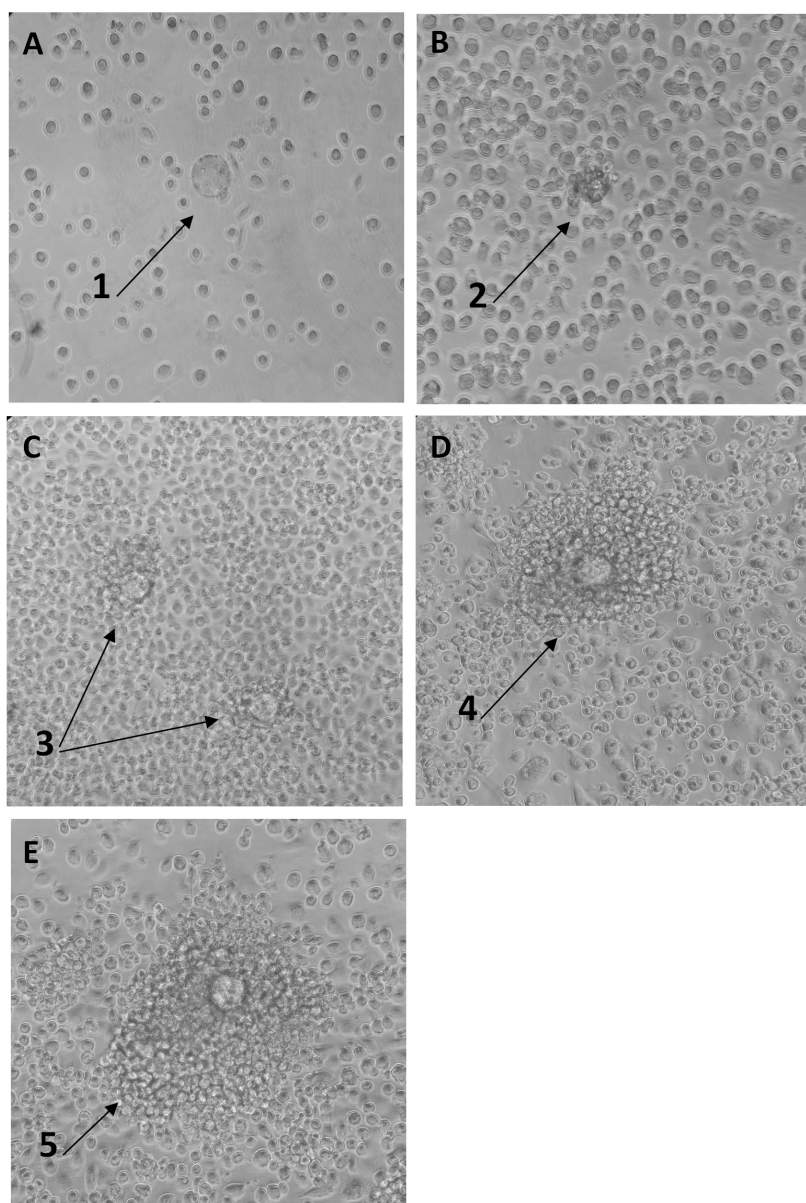


Figura 3.4: Fotomicrografias representativas dos granulomas formados *in vitro* por macrófagos M1 cocultivados com esferas recobertas com o antígeno celular (cAg) de *P. brasiliensis*. Estão representados granulomas (setas) classificados como 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) ou 5 (E) - Aumento 200X.

3.7. Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos M1 e M2

A análise da capacidade fagocítica das células M1 e M2, foi avaliada por citometria de fluxo. Para isso, leveduras de *P. brasiliensis* da cepa 18 foram marcadas com CFSE (Sigma – Aldrich) na concentração de 1,5 μ M em PBS durante 5 minutos. Após a marcação as células fúngicas foram lavadas com Meio RPMI

suplementado com SBF (10%). Uma parte da suspensão de fungo marcado com CFSE foi incubada por 15 minutos com soro (10%) proveniente de pacientes com PCM para opsonização das leveduras. A seguir as leveduras foram cocultivadas com células M1 ou M2 na proporção de 1:1 durante 4 horas em estufa contendo 5% de CO₂. Como controle, utilizamos partículas de Dextran-40 conjugadas a FITC, adicionando 1mg/mL de partículas e mantendo pelo mesmo período de incubação acima. Após o período de cultura, as células foram coletadas, lavadas com PBS, fixadas com formaldeído 2% e analisadas em citômetro de fluxo para avaliar a porcentagem de células capazes de fagocitar as células fúngicas ou partículas de dextran.

Para confirmar os resultados obtidos na citometria de fluxo, a capacidade de fagocitose dos macrófagos também foi avaliada por meio de microscopia de imunofluorescência. Para isso, os macrófagos foram diferenciados em M1 e M2 diretamente em lâminas específicas para cultura celular (Millicell EZ slide - Millipore Corp.) de 8 cavidades (5x10⁵ células por cavidade). Após os 5 dias de diferenciação, os sobrenadantes foram removidos adicionando-se sobre os macrófagos células leveduriformes de *P.brasiliensis* previamente marcadas com CFSE (razão de 1:1 - ver acima) ou partículas de dextran conjugadas a FITC (1mg/mL). As lâminas foram então incubadas por 2 horas em estufa de CO₂ a 37°C. A seguir foram realizadas 5 lavagens com PBS a 37°C para remoção das células leveduriformes e partículas não fagocitadas. As células foram então incubadas com anticorpo anti-CD14 conjugado a PE por 15 minutos. Após novas lavagens (2 vezes), as células foram fixadas com formaldeído a 2%, por 20 minutos. As lâminas foram lavadas por 5 vezes com PBS para remoção do fixador. Após as lavagens foi removido o excesso de líquido das lâminas, adicionando-se o corante de DNA DAPI (Molecular Probes). As lâminas foram recobertas com lamínulas e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 90i).

3.8. Determinação da capacidade fungicida de macrófagos

Para determinação da capacidade fungicida, após a diferenciação, os macrófagos foram cultivados em meio RPMI suplementado (soro bovino fetal a 10%, inativado, L-glutamina a 2mM e gentamicina a 5 µg/mL) em placas de cultura de 96 cavidades com fundo chato (100 x 10³ células/cavidade) por 4 e 24 horas, juntamente células leveduriformes das cepas Pb18 e Pb265 (relação entre o número

de leveduras: macrófagos de 1:50) e incubadas em estufa a 37°C (CO₂ a 5% com atmosfera saturada por vapor d'água) por 4 ou 24 horas. Após cada período de cocultura, as culturas foram homogeneizadas e cerca de 100µl foi plaqueado em meio BHI (suplementado com fator de crescimento obtido de culturas de *P. brasiliensis*, soro normal de cavalo e solução antibiótica penicilina/estreptomicina) e incubadas em estufa a 36°C. O número de CFUs foi determinado a partir do 5° até o 15° dia de cultura e então corrigido pelo fator de diluição e expresso em CFU/mL.

A atividade fungicida (% de morte) foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de atividade fungicida} = 1 - \frac{\text{Número de CFUs das placas experimentais}}{\text{Número de CFUs das placas controle}} \times 100$$

3.9. Determinação da produção de H₂O₂ e Oxido nítrico (NO) por Macrófagos M1 e M2

A avaliação da produção de H₂O₂ pelos macrófagos M1 e M2 foi realizada por meio de citometria de fluxo utilizando a marcação com dihidrorodamina-123 (DHR-123) [75]. Para isso, macrófagos (M1 e M2) obtidos através de diferenciação *in vitro* foram incubados com 4µM de DHR-123 (Invitrogen - Molecular Probes) por 30 minutos no escuro. Após a incubação as células foram lavadas 2 vezes com meio RPMI e incubadas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* da cepa Pb18 (razão 1 macrófago para cada levedura) por 1 hora a 37°C em estufa de CO₂ (5%). Como controle positivo os macrófagos foram estimulados com PMA (50ng/mL - 1 hora). Após o período de incubação as células foram coletadas, transferidas para tubos microtitulação e adicionado 200 µL do tampão PBS-BSA seguido de centrifugação. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas (vórtex) e adicionado 200 µL de formaldeído a 2% em PBS a cada cavidade. As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScanto – Beckton & Dickinson), por meio de software específico (Diva – Beckton & Dickinson). As leituras foram realizadas em um intervalo máximo de 24 horas e os resultados expressos em porcentagem de células positivas e intensidade média de fluorescência.

Para a avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO) pelos macrófagos M1 e M2, utilizamos o mesmo protocolo descrito acima, com a marcação dos macrófagos foi feita com 0,5 µg/mL de DAF-FM (diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluoresceína - Invitrogen - Molecular Probes).

3.10. Avaliação da atividade de Arginase I

Para avaliação da atividade da arginase-I, após a diferenciação as células foram estimuladas ou não com leveduras de *Pb18* (razão 1:1) por 4 horas. Após o tempo de estímulo as células foram coletadas, cerca de 1×10^6 células por condição, lavadas com PBS (1000g a 4°C por 10 minutos), em seguida as células foram lisadas pela incubação por 10 minutos com tampão tris-HCL (10mM pH 7.4) contendo 1 µM de pepstatina A, 1 µM de leupeptina e 0,4% de TritonX-100 (100µL/condição). As amostras foram centrifugadas a 14000g a 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante armazenado a -80°C até o momento de realização do teste. Para tal utilizamos o "kit" - Arginase Assay (Abnova), conforme instruções do fabricante.

3.11. Avaliação da diferenciação de linfócitos T CD3⁺ cocultivados com macrófagos M1 ou M2

Para avaliarmos a capacidade de macrófagos M1 e M2 em induzir a ativação e diferenciação de linfócitos T em células produtoras de citocinas foram realizadas os seguintes experimentos: macrófagos diferenciados em M1 ou M2 foram incubados com leveduras de *P. brasiliensis* da cepa Pb18 por 4 horas (proporção levedura: macrófago = 1:10). Após esse período, os macrófagos foram incubados com linfócitos CD3⁺ (proporção de 10 macrófagos para cada linfócito - 10:1) por um período de 5 dias. Após esse período as células foram reestimuladas com PMA (50ng/mL) e Ionomicina (250ng/mL), na presença de brefeldina A (1µg/mL) por um período de 6 horas. Após a incubação as células foram coletadas e centrifugadas a 300 g por 10 minutos a 4°C. Em seguida foi realizada marcação de superfície e intracelular para análise por citometria de fluxo, conforme descrito abaixo. Como controles foram realizadas culturas onde os linfócitos foram mantidos isolados sem estímulo ou estimulados com PMA+ionomicina.

3.11.1. Citometria de fluxo de linfócitos T cocultivados com Macrófagos M1 e M2

Para a realização da marcação de linfócitos para análise por citometria de fluxo do experimento descrito acima foram realizados os seguintes procedimentos:

Para a marcação de superfície, 20µL da suspensão de células (aproximadamente 5×10^5 células) foram transferidos para placas de microtitulação (96 cavidades, fundo em U) contendo a mistura de anticorpos (anti-CD4 (Percp), anti-CD3 (Pe-Cy7), anti-CD25 (PercP) e anti-CD8 (APC-Cy7) (todos Biolegend), diluídos em 20 µL de PBS-BSA(0,1%)-azida sódica (2mM) (PBS-B-A), seguido de incubação por 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação, as placas foram centrifugadas (300 g por 10 minutos a 4°C), os sobrenadantes descartados e 200 µL do tampão PBS-B-A foram adicionados a cada poço. Após centrifugação, os sobrenadantes foram descartados, as células ressuspensas (vórtex) e 150 µL de formaldeído a 2% em PBS foram adicionados a cada cavidade seguindo-se incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, foi realizada uma nova centrifugação e as células foram ressuspensas em 150 µL de tampão de permeabilização (PBS – BSA(0,1%) – Saponina(0,5%)), com incubação da placa por 10 minutos à temperatura ambiente. As placas foram novamente centrifugadas, e os sobrenadantes descartados. As células foram adicionadas a uma mistura (20 µL) de anticorpos (anti-IFN- γ (FITC), anti-IL-17 (PE), anti-IL-22 (e-fluor 660), anti-IL-4 (APC) ou anti-Foxp3 (alexa 488)). Para marcação intracitoplasmática as células foram incubadas em tampão de permeabilização em temperatura ambiente por 30 minutos: Após a incubação, foram adicionados a cada cavidade 150µL de tampão de permeabilização e a placa foi centrifugada (300 g por 10 minutos a 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas (vórtex) e adicionado 150 µL de tampão PBS-B-A. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 150 µL de formaldeído a 2%, transferidas para tubos de microtitulação e analisadas em citômetro de fluxo (FACScanto – Beckton & Dickinson), por meio de software específico (Diva – Beckton & Dickinson). As leituras foram realizadas em um intervalo máximo de 24 horas e os resultados expressos em porcentagem de células positivas, conforme exemplificado na figura abaixo (figura 3.5).

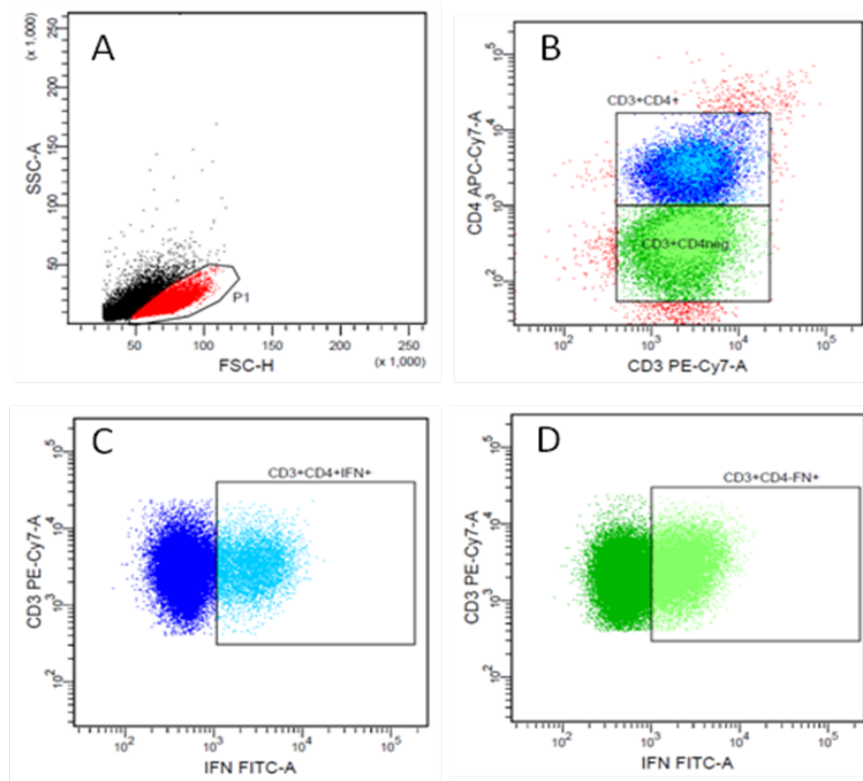


Figura 3.5: Dot-plots representativos da forma de análise da produção de citocinas por linfócitos cocultivados com macrófagos M1 ou M2. Em um primeiro momento as células foram analisadas por tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) (**A**), sendo selecionado uma região (P1 - vermelho). Em seguida foi gerado um outro dot-plot (**B**) no qual se analisou a expressão de CD4 e CD3 nas células da região P1, sendo definidas duas populações ($CD3^+CD4^+$ - azul; e $CD3^+CD4^-$ - Verde). Em seguida foram definidos novos gráficos (**C** e **D**) para analisar a marcação para citocinas (IFN- γ nas populações $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD4^-$).

3.12. Imuno-histoquímica de lesões de mucosa oral e linfonodos de pacientes com PCM

Foram analisadas a marcação de células para CD3, CD8, CD68, IL-12, IL-23, IL-10, receptor de manose (CD206), iNOS e metaloproteinases (MMP1, MMP2, MMP3 e MMP9). Os cortes utilizados para o testes foram os que apresentavam lesões com leveduras de *P. brasiliensis*.

Os blocos foram mantidos a -20°C durante 30 minutos quando então foram cortados (espessura de $4\mu\text{m}$) em micrótomo Histocut 820 II (Leica, Mussioch, Alemanha). Cortes seriados foram colocados no banho histológico com água destilada a 50°C e coletados em lâminas Start Frost (Kinttel Galser, Alemanha)

identificadas com o número de cada caso. As lâminas foram mantidas em estufa a 80°C por 1 hora, em seguida foram guardadas em caixas porta-lâminas até a realização da reação de imuno-histoquímica.

As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas com várias passagens em xilol e alcoóis graduados até a lavagem em água destilada; em seguida foi realizada a recuperação antigênica com tampão específico para cada anticorpo (citrato pH 6.0, Tris-EDTA pH 9.0 ou EDTA- pH8.0) em panela a vapor, durante 45 minutos. Procedeu-se então ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 10v durante 15 minutos, seguido de lavagem com água destilada e incubação com bloqueio de proteína (Dako, Carpinteria, EUA) por 10 minutos. A incubação com o anticorpo primário (anti-CD3, anti-CD8, anti-CD68, anti-IL-12, anti-IL-23, anti-IL-10, anti-CD206, anti-iNOS, anti-MMP1, anti-MMP2, anti-MMP3 e anti-MMP9) foi feita overnight em câmara úmida. Os anticorpos primários foram diluídos em solução PBS e soro albumina bovina a 2% (PBS-BSA) e dispensados sobre os cortes (A procedência dos anticorpos primários empregados nesta etapa está informada na tabela 3.1).

Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado a um polímero contendo peroxidase (Envision, Dako, Carpinteria, EUA ou MACH4, Biomedical, EUA). Na tabela 1 estão listados os anticorpos primários e os conjugados utilizados nas reações de IHQ. As reações foram reveladas pela adição do substrato cromógeno 3,3 diaminobezidina (DAB, Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, EUA) a 0,6%, seguida da ativação com peróxido de hidrogênio 30v durante 5 minutos e coloração nuclear com hematoxilina de Harris por 1 minuto.

Após o término da reação, os cortes foram desidratados, diafanizados e as lâminas foram montadas com Entelan (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, EUA). O controle negativo consistiu em uma lâmina do mesmo tecido analisado, na qual o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA.

Tabela 3.1 - Anticorpos e conjugados utilizados nas reações de IHQ

Anticorpo	Marca	Clone/ Lote	Conjugado (polímero)
Anti-CD3	Dako	A0452/128	Envision
Anti-CD8	Dako	M7103/119	Envision
Anti-CD68	Dako	M0814/119	Envision
Anti-IL-10	Santa Cruz	sc-73309	MACH4
Anti-IL-12	R&D Systems	24910.1	MACH4
Anti-IL-23	Biolegend	B114200	MACH4
Anti-iNOS	Abcam	AB15323	MACH4
Anti-CD206	Abcam	AB117644	MACH4
Anti-MMP1	Biolegend	F15P3B6	MACH4
Anti-MMP2	Biolegend	F14P4D3	MACH4
Anti-MMP3	Biolegend	F36P1B4	MACH4
Anti-MMP9	Biolegend	F11P2C3	MACH4

3.13. Avaliação das reações de IHQ

As lâminas de IHQ foram analisadas por microscopia ótica (Olympus, modelo CX31RTSF, Japão). Para a avaliação da composição celular do infiltrado inflamatório e da presença de citocinas. Foram analisados três campos diferentes em cada lâmina (aumento 400X), levando-se em consideração a presença do fungo. Foi utilizado o mesmo critério de análise para as lâminas de controle negativo e lâminas destinadas para diagnóstico anatomopatológico de doenças não relacionadas à PCM.

3.14. Análise estatística

Para a comparação dos diferentes tratamentos realizados com macrófagos M1 ou M2 utilizamos o teste de t pareado (2 tratamentos) ou ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey (> de 2 tratamentos); para a comparação dos parâmetros entre macrófagos M1 e M2 utilizamos o teste de t de Student. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização fenotípica de macrófagos M1 e M2 diferenciados in vitro a partir de monócitos do sangue periférico (células CD14⁺)

Em um primeiro momento, demos início à caracterização fenotípica e funcional dos macrófagos M1 e M2 frente ao estímulo com células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

Com o intuito de avaliar o fenótipo dos macrófagos M1 e M2 realizamos culturas onde as células foram submetidas à estimulação com leveduras do *P. brasiliensis* por 4 e/ou 24 horas. Nas figuras abaixo estão mostrados os resultados obtidos na análise da frequência (% de células positivas) ou da expressão relativa de moléculas/células (Intensidade Média de Fluorescência - IMF). A análise da IMF foi realizada somente nos casos onde a frequência de células positivas foi muito alta em todas as condições (próximo a 100%), não permitindo observar diferenças significativas na frequência.

Como pode ser observado na figura abaixo, nossos resultados revelam que macrófagos M1 apresentam maior frequência de células positivas para CD1a se comparados aos macrófagos M2, tanto em culturas de 4 quanto de 24 horas (Figura 4.1 A). Observamos um aumento da porcentagem de células positivas para CD209 nos macrófagos M2 com estimulação de 4 horas com leveduras do Pb18 (Figura 4.1 B), também encontramos macrófagos M1 com um aumento da expressão desse receptor no período de estimulação de 24 horas ao compararmos ao tempo de 4 horas (Figura 4.1 B). Em relação aos marcadores associados à fagocitose notamos uma maior frequência na marcação desses receptores (CD209, CD205, CD206, CD163 e CD36) nos macrófagos M2 principalmente no período de 4 horas de cultura. Em relação ao receptor de manose (CD206), observamos uma diminuição da intensidade média de fluorescência nos macrófagos M2 quando estimulados por 24 horas com o fungo Pb18 (Figura 4.1 D). Também notamos que os macrófagos M2 diminuem a expressão de células positivas para CD163 e CD36 quando estimulados por 24 horas em comparação as culturas de 4 horas com Pb18 (Figuras 4.1 E e 4.1 F).

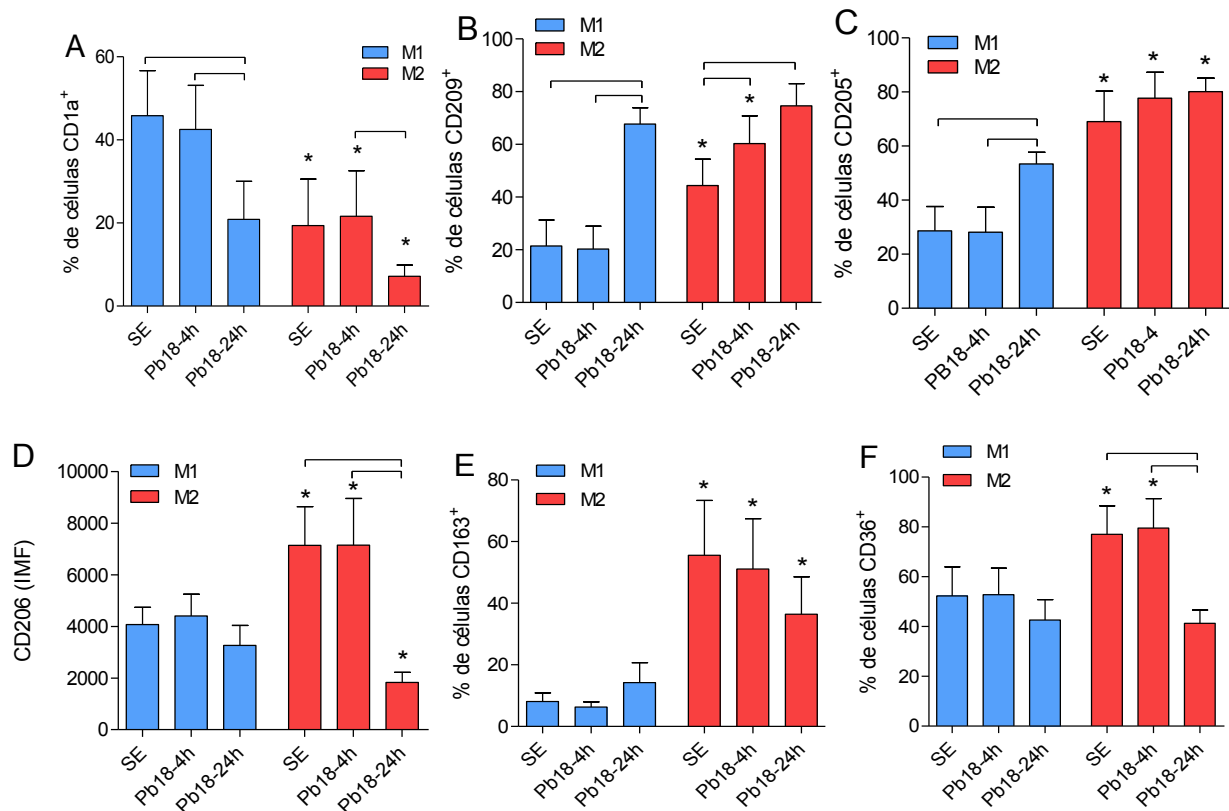


Figura 4.1 - Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células positivas para CD1a (A), CD209 (B), CD205 (C), CD163 (E) e CD36 (F) ou da intensidade média de fluorescência (IMF) CD206 (D), em macrófagos M1 e M2 mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados por 4 e 24 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 - razão 1:1). **Análise estatística: Comparação entre os estímulos no mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. Colchetes representam $p < 0,05$. **Comparação entre os grupos:** Teste de *t*. * $p < 0,05$ em comparação à macrófagos M1 mantidos nas mesmas condições.

Também avaliamos a expressão das moléculas CD14 e CD16 nos macrófagos após o estímulo com o fungo nas culturas de 4 e 24 horas. Nossos resultados mostraram que há uma diferença na expressão (IMF) para CD14 nos macrófagos M2, sendo que estes apresentam expressão muito maior quando comparados a macrófagos M1 em culturas de 4 e 24 horas (Figura 4.2 A). Porém observamos que macrófagos M2 diminuem IMF nas culturas de 24 horas ao compararmos sua expressão em 4 horas de cultura (Figura 4.2 A). Observamos que macrófagos M1 aumentam a expressão (IMF) em 24 horas para CD14 quando os

comparamos essa mesma expressão em culturas de 4 horas (Figura 4.2 A). Em relação à molécula CD16, observamos que há uma maior frequência de células positivas para essa molécula nos macrófagos M2 em comparação aos macrófagos M1 (figura 4.2 B). Além disso, observamos que a presença do fungo leva a uma diminuição na expressão de CD16 nos macrófagos M1 e M2.

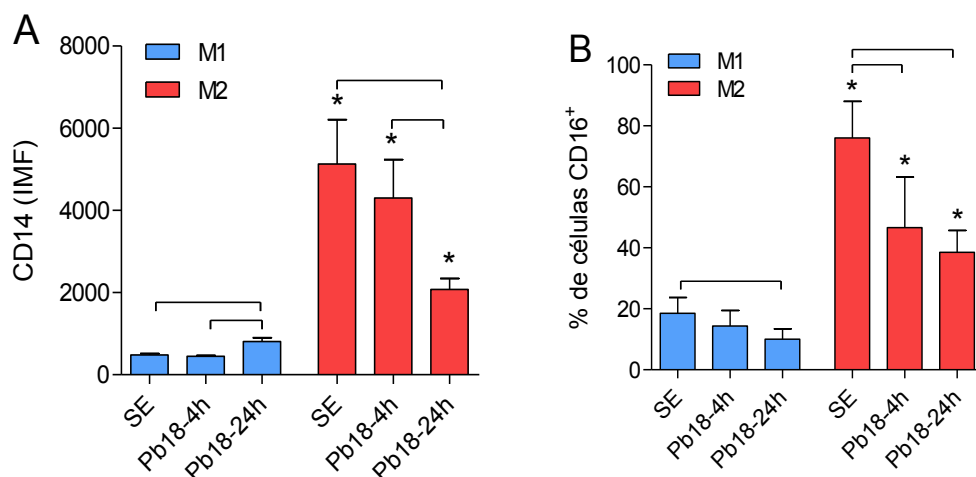


Figura 4.2 - Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células positivas ou da intensidade média de fluorescência (IMF) em macrófagos M1 e M2 mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados por 4 e 24 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 - razão 1:1). Análise da expressão de CD14 (IMF) (A) e CD16 (B). **Análise estatística: Comparação entre os estímulo no mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. Colchetes representam $p < 0,05$. **Comparação entre os grupos:** Teste de *t*. * $p < 0,05$ em comparação à macrófagos M1 mantidos nas mesmas condições.

Em relação às moléculas envolvidas no reconhecimento do fungo e que levam à ativação das células (Dectina-1 e TLR2 e TLR4), nossos resultados mostraram que macrófagos M2 na presença do Pb18 por 24 horas aumentam a expressão (IMF) de Dectina1 se comparados a expressão de 4 horas (Figura 4.3 A), já macrófagos M1 diminuem essa expressão quando na presença de leveduras do Pb18 no período de 4 e 24 horas (Figura 4.3 A). Em relação à frequência de células positivas para TLR2 e TLR4 observamos que macrófagos M2 apresentam maior expressão desses receptores em culturas de 4 horas na presença do fungo, quando comparados aos macrófagos M1 nas mesmas condições (Figura 4.3 B e Figura 4.3

C). Também notamos que macrófagos M1 aumentam sua expressão do TLR4 no período de 4 e 24 horas quando comparados às células não estimuladas (Figura 4.3 C).

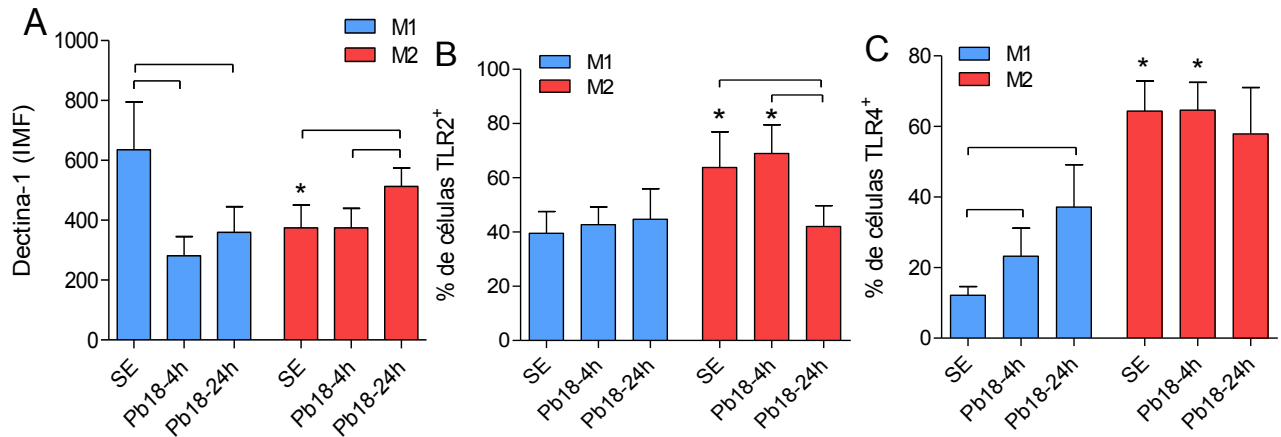


Figura 4.3 - Análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência (IMF) para dectina-1 (A) e da porcentagem de células positivas para TLR2 (B) e TLR4 (C) em macrófagos M1 e M2 mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados por 4 e 24 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 - razão 1:1). **Análise estatística: Comparação entre os estímulo no mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. Colchetes representam $p < 0,05$. **Comparação entre os grupos:** Teste de *t*. * $p < 0,05$ em comparação à macrófagos M1 mantidos nas mesmas condições.

Em relação às moléculas relacionadas à apresentação de antígenos (MHC de classe I e II) e moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86), notamos que macrófagos M1 apresentam maior expressão (IMF) de MHC II em células não estimuladas e quando estimuladas por 4 e 24 horas com Pb18, em comparação aos macrófagos M2 nas mesmas condições (Figura 4.4 B). Também observamos que macrófagos M2 no período de 24 horas na presença do Pb18 aumentam a expressão de MHCII quando comparados às culturas não estimuladas ou estimuladas por 4 horas (Figura 4.4 B).

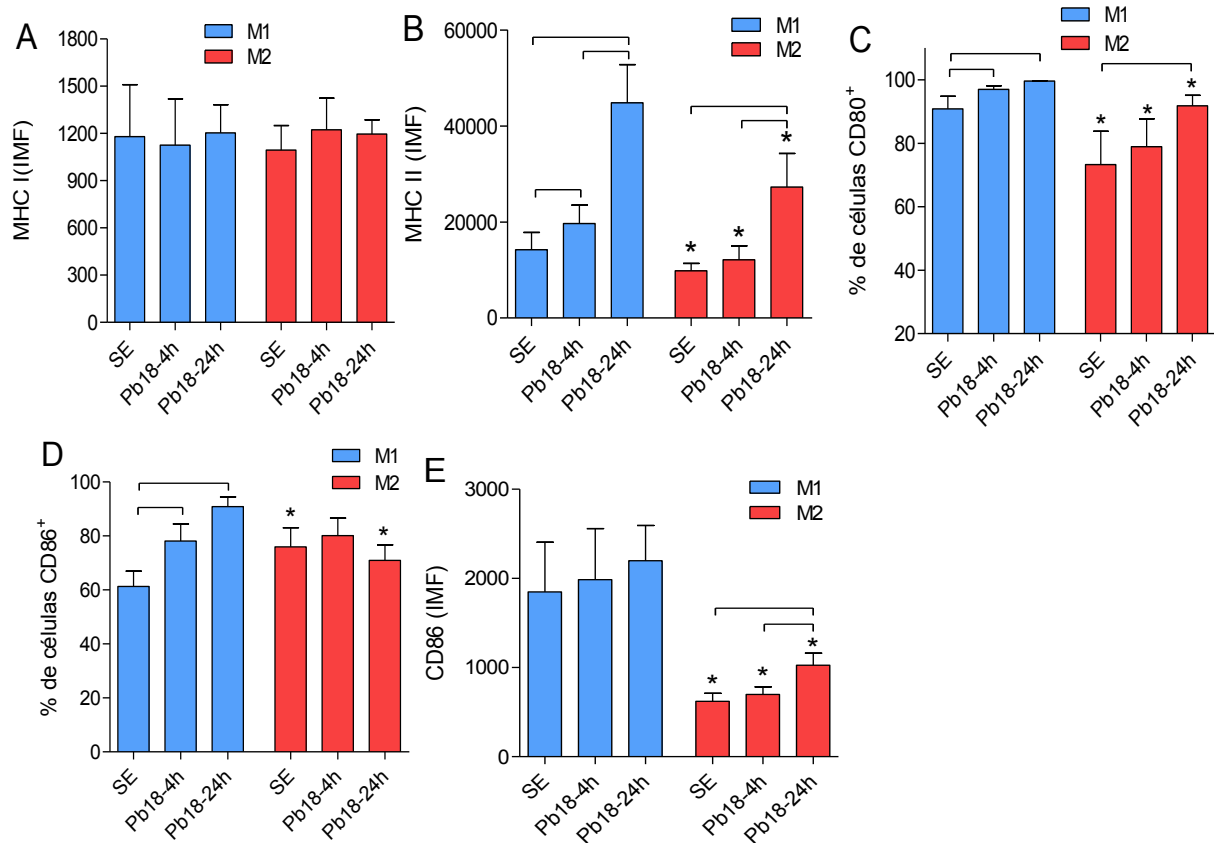


Figura 4.4 - Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células positivas para CD80 (C) e CD86 (D) ou da intensidade média de fluorescência (IMF) para MHC de classe I (A), MHC de classe II (B) e CD86 (E), em macrófagos M1 e M2 mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados por 4 e 24 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18 - razão 1:1). **Análise estatística:** **Comparação entre os estímulo no mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. Colchetes representam $p < 0,05$. **Comparação entre os grupos:** Teste de *t*. * $p < 0,05$ em comparação à macrófagos M1 mantidos nas mesmas condições.

Em relação às moléculas coestimulatórias, observamos uma maior frequência de macrófagos M1 CD80⁺ em comparação aos macrófagos M2 (figura 4.4 C). Sendo que a frequência de células positivas nos dois tipos de macrófagos aumenta após 24 horas de estímulo (figura 4.4 C). Em relação ao CD86, pode-se observar que macrófagos M2 não estimulados apresentam maior frequência de positividade do que macrófagos M1 não estimulados (figura 4.4 D). Mas após o estímulo, macrófagos M1 apresentam aumento gradativo da expressão de CD86,

apresentando após 24 horas maior frequência de células positivas do que células M2 (figura 4.4 D). Também é possível observar que macrófagos M1 apresentam maior expressão de moléculas CD86/célula (IMF) do que macrófagos M2 em todas as condições analisadas. (Figura 4.4 E).

4.2. Análise da produção de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases de matriz por macrófagos M1 e M2

Após termos analisado o fenótipo dos macrófagos M1 e M2 realizamos as dosagens de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases de matriz (MMPs) produzidas e secretadas pelos dois tipos de macrófagos após estímulo com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (4 e 24 horas).

Observamos que nos sobrenadantes de cultura de macrófagos M1 estimulados com o fungo há uma maior quantidade de IL-12p70 (4 e 24 horas), TNF- α (4 horas) e IL-6 (4 e 24 horas) quando comparados com culturas de macrófagos M2 (figuras 4.5 A, 4.5 B e 4.5 C respectivamente). Também foi possível notar que macrófagos M2 apresentam um aumento da produção de TNF- α e IL-6 após o estímulo de 24 horas com o fungo ao compararmos a essa mesma produção em 4 horas de cultura (figura 4.5 B e 4.5 C).

A dosagem de IL-10 e IL-1 β , demonstrou que macrófagos M2 apresentam maior produção em 4 e 24 horas de culturas com o Pb18 se comparados aos macrófagos M1 (Figura 4.5 D e Figura 4.5 E). Notamos que macrófagos M1 aumentam a produção de IL10 na estimulação de 24 horas se comparamos a sua produção com estímulo de 4 horas com leveduras do Pb18, contudo em níveis muito menores do que macrófagos M2 (Figura 4.5 E). Não observamos diferenças em relação à produção de IL-23 entre os dois tipos de macrófagos (figura 4.5 F).

Já na análise da produção de TGF- β demonstrou que a produção é similar entre macrófagos M1 e M2 no período de cultura de 4 horas, ocorrendo um aumento dessa produção nos macrófagos M1 nas culturas de 24 horas (Figura 4.5 G). Como pode ser observado na figura 4.5 H, macrófagos M1 produzem uma quantidade maior de IL-37 quando estimulados por 24 horas na presença do Pb18 ao compararmos a mesma condição nos macrófagos M2, nas culturas de 4 horas os dois fagócitos apresentam quantidades similares de produção dessa citocina.

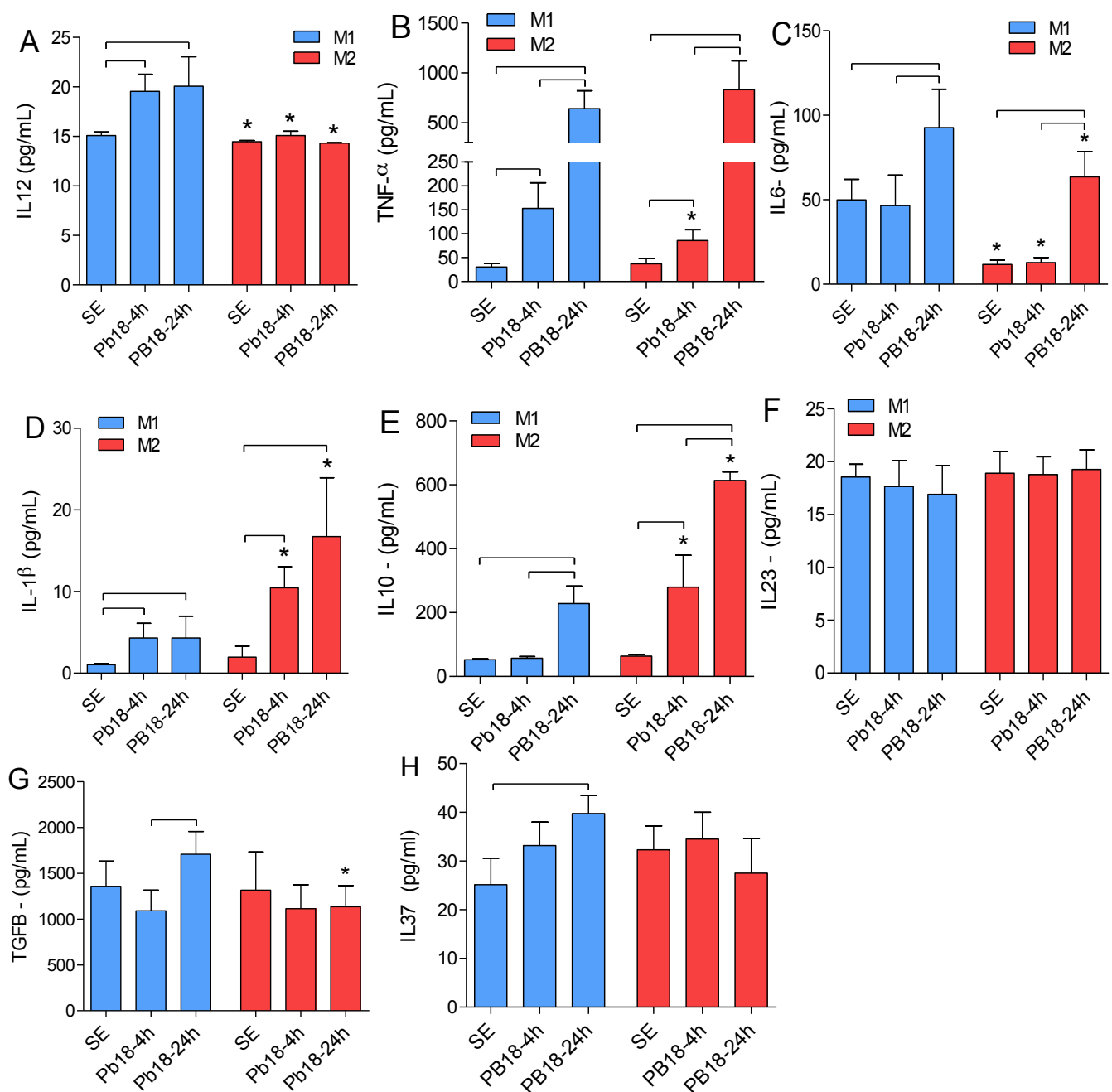


Figura 4.5 - Avaliação da produção de IL-12p70 (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-1 β (D), IL-10 (E), IL-23 (F) TGF- β (G), IL-37 (H) por macrófagos M1 e M2, mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18) por de 4 e 24 horas. A dosagem das citocinas foi realizada por ELISA (DuoSet – R&D System) em sobrenadantes de cultura. **Análise estatística:** Comparação entre os estímulo no mesmo grupo: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. Colchetes representam $p < 0,05$. Comparação entre os grupos: Teste de *t*. * $p < 0,05$ em comparação à macrófagos M1 mantidos nas mesmas condições.

Em relação às quimiocinas, observamos que macrófagos M2 produzem mais CXCL8 do que macrófagos M1 após o estímulo de 4 e 24 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (figura 4.6 A). A produção de CXCL10 também foi maior pelos macrófagos M2 em células não estimuladas ou em culturas de 4, no tempo de 24 horas não observamos diferenças de produção entre os dois fagócitos (figura 4.6 C). A produção de CCL5 aumenta nos dois tipos de macrófagos após o estímulo com o fungo, porém de forma mais evidente nos macrófagos M1 (figura 4.6 D). Não observamos diferenças na produção de CXCL9 (figura 4.6 B).

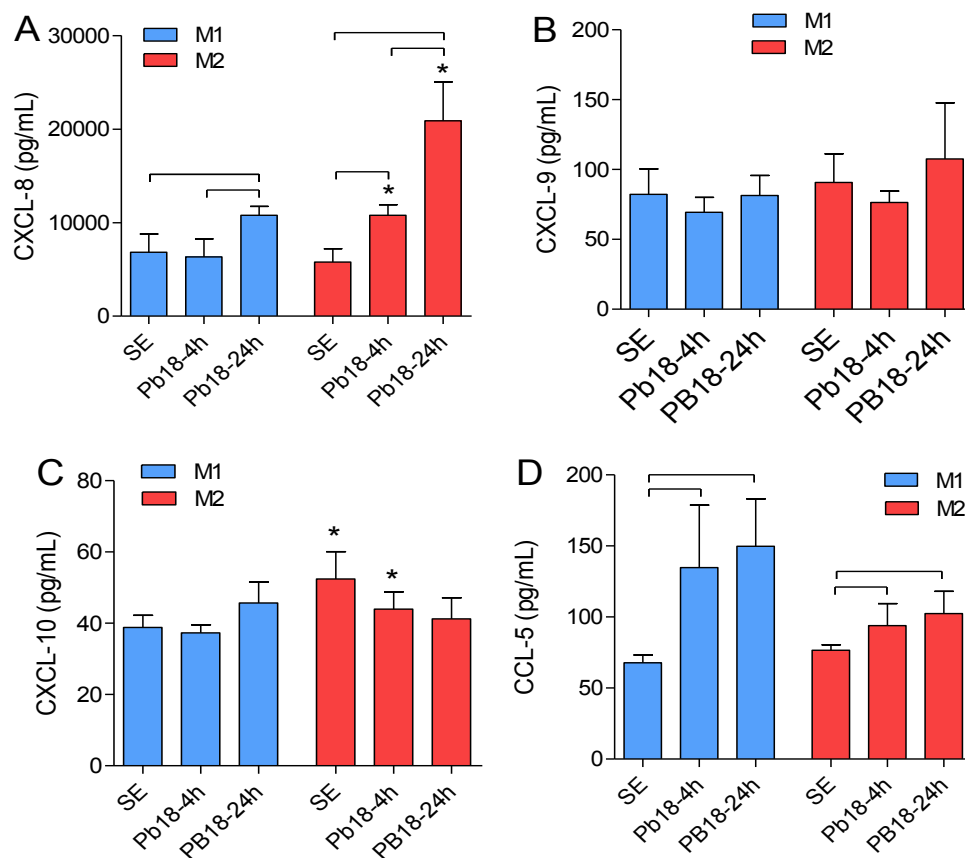


Figura 4.6 - Avaliação da produção de CXCL8 (A), CXCL9 (B), CXCL10 (C) e CCL5 (D) por macrófagos M1 e M2, mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18) por 4 e 24 horas. A dosagem das citocinas foi realizada por ELISA (DuoSet – R&D System) em sobrenadantes de cultura. **Análise estatística: Comparação entre os estímulos no mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. Colchetes representam $p < 0,05$. **Comparação entre os grupos:** Teste de *t*. * $p < 0,05$ em comparação à macrófagos M1 mantidos nas mesmas condições.

Também avaliamos a produção de metaloproteinases de matriz (MMPs) nos sobrenadantes de culturas de 4 e 24 horas. Pudemos observar que macrófagos M1 apresentaram maior produção de MMP1 em 4e 24 horas de cultura (figura 4.7 A) e MMP2 no tempo de 4 horas na presença de Pb18. Notamos uma diminuição da produção de MMP2 pelos macrófagos M1 e M2 após 24 horas de estímulo quando comparado a culturas de 4 horas (figura 4.7 B). Também observamos nas culturas de macrófagos M1 maior produção de MMP9 no período de 4 horas com o fungo em comparação as culturas com macrófagos M2 (figura 4.7 D). Além disso, macrófagos M2 aumentam a expressão de MMP9 em culturas de 24 horas em comparação a sua produção no tempo de 4 horas. Não encontramos diferenças na produção de MMP-3 em culturas de 4 e 24 horas (figura 4.7 C).

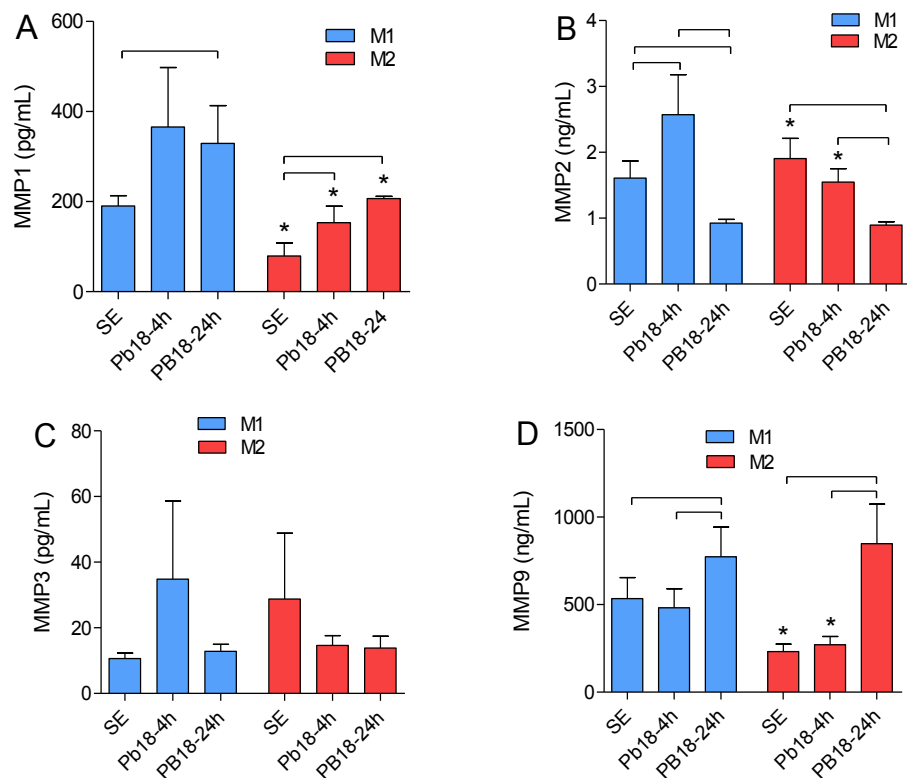


Figura 4.7 - Avaliação da produção de MMP1 (A), MMP2 (B), MMP3 (C) e MMP9 (D) por macrófagos M1 e M2, mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18) por 4 e 24 horas. A dosagem das citocinas foi realizada por ELISA (DuoSet – R&D System) em sobrenadantes de cultura. **Análise estatística:** Comparação entre os estímulo no mesmo grupo: ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. Colchetes representam $p < 0,05$. **Comparação entre os grupos:** Teste de *t*. * $p < 0,05$ em comparação à macrófagos M1 mantidos nas mesmas condições.

4.3. Avaliação da formação de granuloma *in vitro*

A análise da formação de granuloma *in vitro* demonstrou que macrófagos M1 são capazes de formar granulomas maiores, com maior número de células ao redor das esferas recobertas com antígenos derivados de *P. brasiliensis*, em relação aos macrófagos M2. É interessante notar que os maiores granulomas foram observados ao redor de esferas recobertas com gp43 e com PPD (figura 4.8). Já os macrófagos M2 somente apresentaram granulomas maiores com esferas recobertas com o antígeno PPD (figura 4.8).

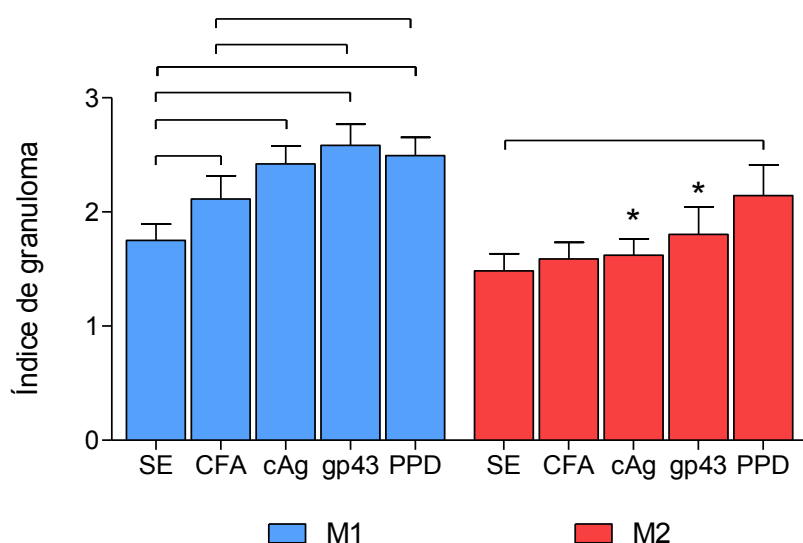


Figura 4.8 - Avaliação da formação de granulomas *in vitro* após 9 dias de cultura de macrófagos M1 e M2 na presença de esferas não sensibilizadas (SE) ou recobertas com diferentes tipos de antígenos (CFA, cAg, gp43 e PPD). Os resultados foram expressos como a média \pm EPM do índice de granuloma calculado conforme descrito em material e métodos. **Análise estatística: Comparação entre as coculturas com diferentes tipos de antígeno:** ANOVA para medidas repetidas com pós-teste de Tukey (o colchete representa $p < 0,05$). **Comparação entre macrófagos M1 e M2:** teste de t de Student - * $p < 0,05$ em relação aos macrófagos M1 nas mesmas condições.

4.4. Análise da capacidade fagocítica de células M1 e M2

Para avaliarmos a capacidade fagocítica de macrófagos M1 e M2 realizamos experimentos nos quais células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram marcadas com CFSE e incubadas por 4 horas (proporção 1:1) com os macrófagos. Para investigar se a opsonização das leveduras poderia ter alguma influência na atividade fagocítica, as células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram tratadas com um pool de soro de pacientes com paracoccidioidomicose antes da incubação com os macrófagos. Como pode ser observado na figura abaixo (figura 4.9 A), verificamos que macrófagos M2 apresentaram maior capacidade fagocítica (em média 2,5 vezes maior) do que macrófagos M1. Também é possível observar que a opsonização das células leveduriformes levou a um aumento da capacidade fagocítica de macrófagos M1, mas não interferiu com essa capacidade nos macrófagos M2 (figura 4.9 A).

Também realizamos experimentos para investigar se o bloqueio da molécula de CD206 interfere com a capacidade fagocítica dos macrófagos M1 e M2. Para isso, antes da incubação com as células leveduriformes os macrófagos foram tratados por 30 minutos com um anticorpo bloqueador de CD206. Verificamos que o bloqueio do CD206 leva à diminuição da capacidade fagocítica de macrófagos M2, mas não interfere com os macrófagos M1 (figura 4.9 A).

Para confirmar os dados de fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis* realizamos experimentos nos quais os macrófagos foram incubados com partículas de dextran marcadas com FITC. Como pode ser observado na figura 4.9 B os macrófagos M2 também apresentaram maior capacidade fagocítica dessas partículas em comparação aos macrófagos M1.

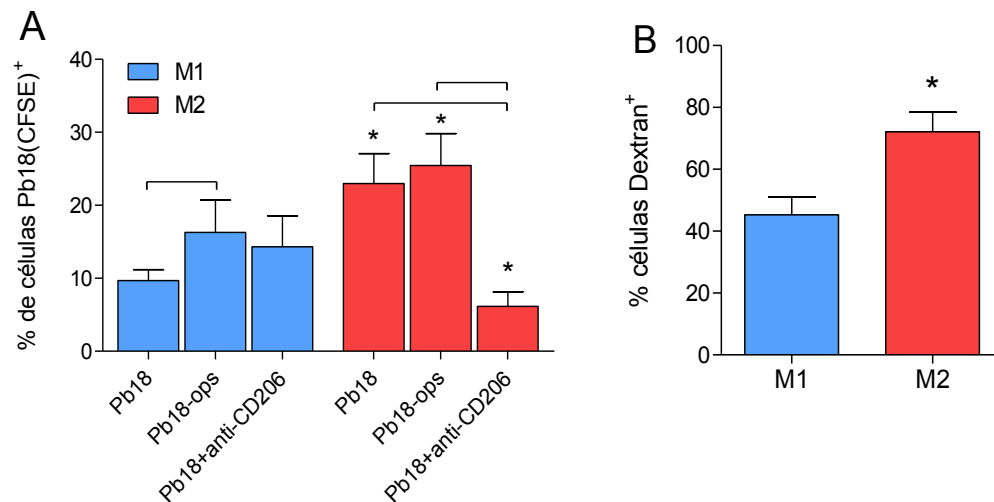


Figura 4.9- Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos por citometria de fluxo. Macrófagos M1 e M2 diferenciados a partir de monócitos do sangue periférico foram cultivados por 4 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* marcadas com CFSE na proporção 1:1 **(A)** ou partículas de dextran marcadas com FITC **(B)**. Foram utilizadas leveduras sem tratamento (Pb18) ou opsonizadas com soro de pacientes com PCM (Pb18-ops). **Análise estatística: Comparação entre as coculturas de fungo não tratados e opsonizados ou com macrófagos tratados com anti-CD206:** Teste ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey (o colchete representa $p < 0,05$). **Comparação entre a capacidade fagocítica de macrófagos M1 e M2:** teste de t de Student - * $p < 0,05$ em relação aos macrófagos M1 nas mesmas condições.

Para confirmar que os macrófagos M1 e M2 estavam realmente fagocitando o fungo e as partículas de dextran, realizamos alguns experimentos de microscopia de imunofluorescência. Os resultados obtidos confirmaram aqueles encontrados na citometria de fluxo. Nas páginas abaixo estão demonstradas as micrografias obtidas de um experimento representativo realizado com macrófagos M1 ou M2 (Figuras 4.10 e 4.11 respectivamente).

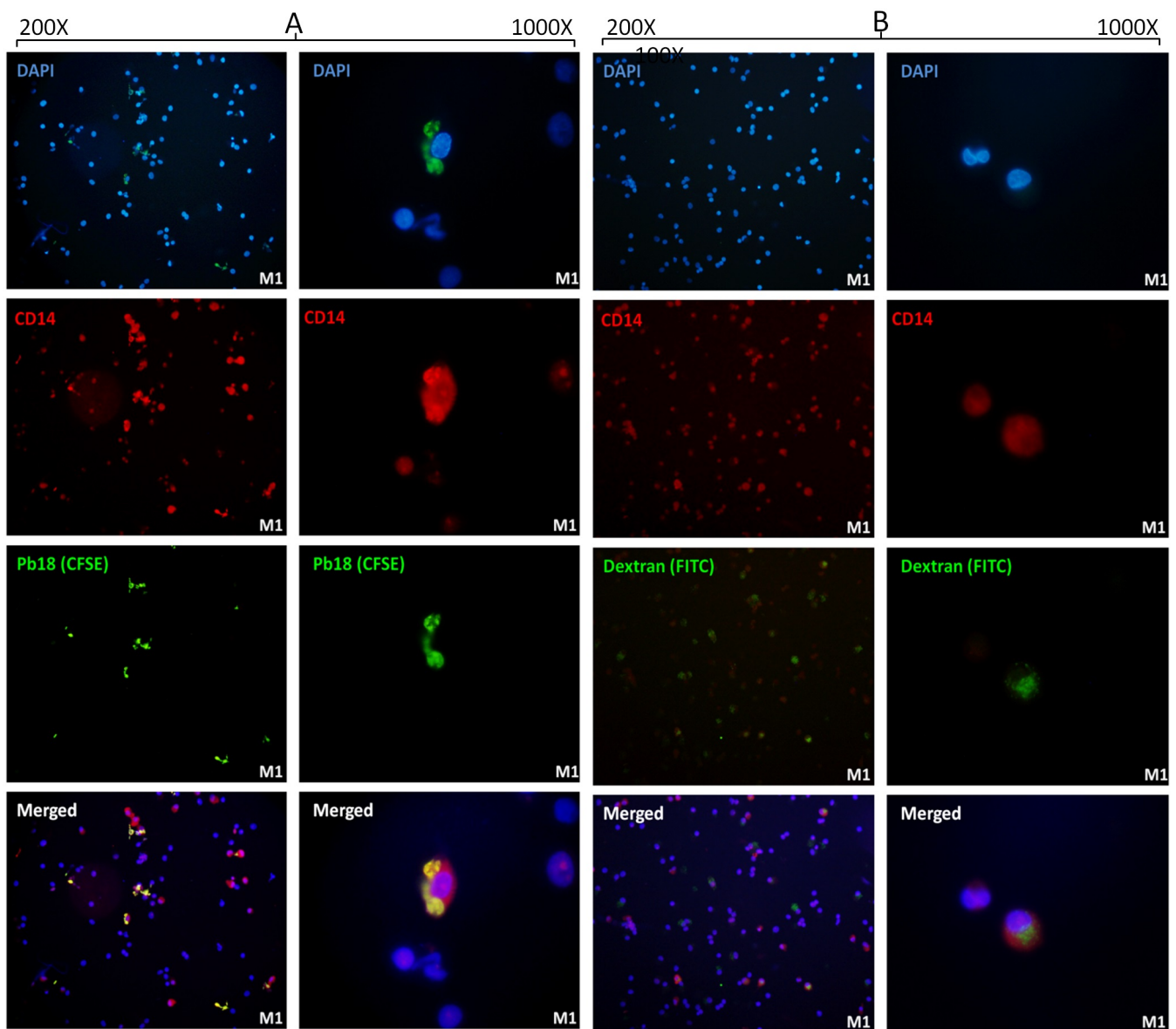


Figura 4.10 - Análise por microscopia de fluorescência da fagocitose de células leveduriformes de *P. brasiliensis* marcadas com CFSE (**A**) ou de partículas de dextran marcadas com FITC (**B**). **Macrófagos M1** foram incubados com células fúngicas ou partículas de dextran por 4 horas. As fotos são representativas de 3 experimentos independentes. Marcação nuclear com DAPI (azul), marcação de superfície com CD14 (vermelho), células leveduriformes ou partículas de dextran (verde) e sobreposição das marcações (merged). Coluna da esquerda aumento de 200X, coluna da direita aumento de 1000X.

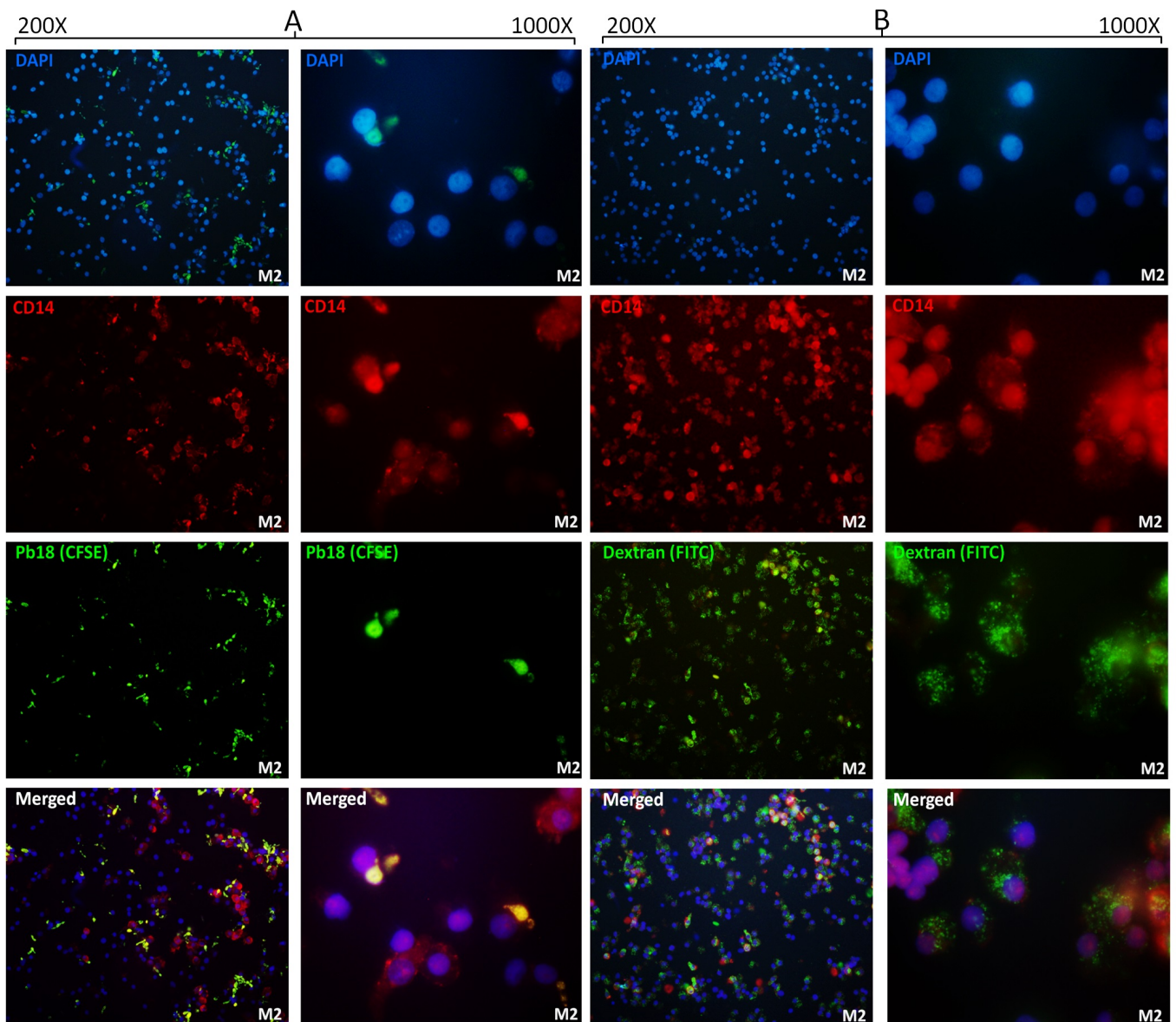


Figura 4.11 - Análise por microscopia de fluorescência da fagocitose de células leveduriformes de *P. brasiliensis* marcadas com CFSE (**A**) ou de partículas de dextran marcadas com FITC (**B**). **Macrófagos M2** foram incubados com células fúngicas ou partículas de dextran por 4 horas. As fotos são representativas de 3 experimentos independentes. Marcação nuclear com DAPI (azul), marcação de superfície com CD14 (vermelho), células leveduriformes ou partículas de dextran (verde) e sobreposição das marcações (merged). Coluna da esquerda aumento de 200X, coluna da direita aumento de 1000X.

4.5. Análise da atividade fungicida dos macrófagos M1 e M2 contra leveduras de *P. brasiliensis*

Também analisamos através da técnica de CFU a atividade fungicida dos macrófagos M1 e M2 contra leveduras do *P. brasiliensis*. Nesses experimentos, também investigamos se a opsonização das leveduras poderia ter alguma influência nessa função dos fagócitos, para isso, as células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram tratadas com um pool de soro de pacientes com paracoccidioidomicose antes da incubação com os macrófagos. Como podem ser observados na figura 4.12, os resultados obtidos mostraram que macrófagos M2 apresentam capacidade fungicida superior à de macrófagos M1. Além disso, a opsonização das leveduras levou a uma maior capacidade fungicida dos macrófagos M1, mas não interferiu na capacidade fungicida de macrófagos M2.

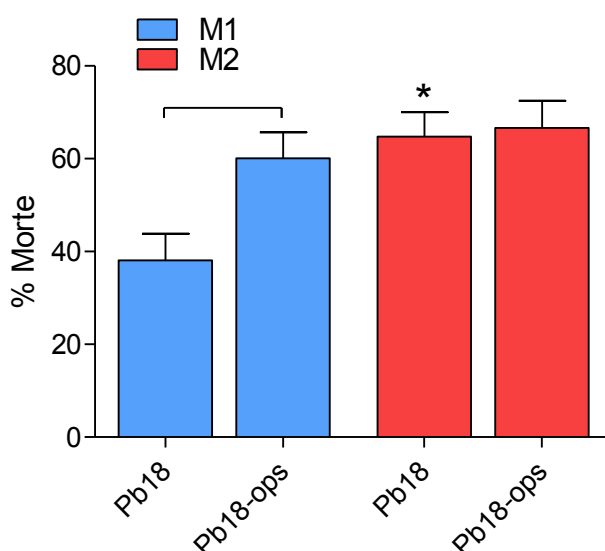


Figura 4.12 - Porcentagem de morte (atividade fungicida) obtidas após 24 horas de coculturas de células leveduriformes de *P. brasiliensis* sem tratamento (Pb18) ou opsonizadas com soro de pacientes com PCM (Pb18-ops) e macrófagos M1 e M2 diferenciados a partir de monócitos do sangue periférico. Proporção de células leveduriformes e macrófagos de 1:50. **Análise estatística: Comparação entre as coculturas de fungo não tratados e opsonizados:** Teste de t pareado (o colchete representa $p < 0,05$). **Comparação entre a capacidade fungicida de macrófagos M1 e M2:** teste de t de Student - * $p < 0,05$ em relação aos macrófagos M1 nas mesmas condições.

4.6. Análise da produção de H_2O_2 e NO pelos macrófagos M1 e M2

Para avaliarmos a produção de H_2O_2 e NO pelos macrófagos M1 e M2, os macrófagos, após diferenciados, foram marcados com dihidrorodamina-123 (DHR-123 para avaliação de H_2O_2) ou com diacetato de 4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluoresceína (DAF-FM - para avaliação da produção de NO) e estimulados por 1 hora com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (proporção 1:1). Como controle positivo os macrófagos foram estimulados com PMA (50ng/mL). Pudemos observar que macrófagos M1 apresentam maior produção de H_2O_2 do que macrófagos M2, tanto após estímulo com células fúngicas quanto após estímulo com PMA (figura 4.13).

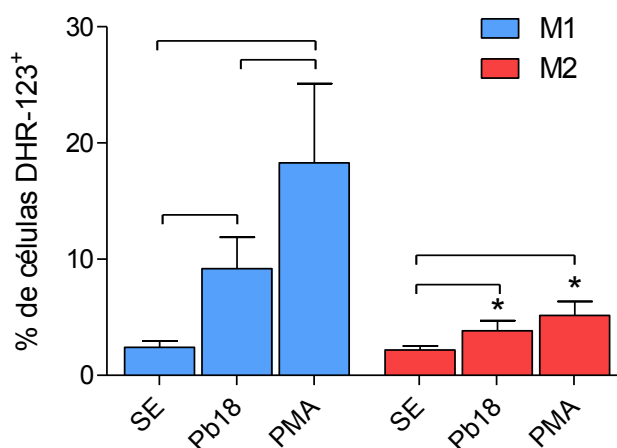


Figura 4.13 - Avaliação da produção de H_2O_2 por citometria de fluxo. Macrófagos M1 e M2 diferenciados a partir de monócitos do sangue periférico foram mantidos sem estímulo ou estimulado por 1 hora com células leveduriformes de *P. brasiliensis* na proporção 1:1 ou com PMA (50ng/mL). **Análise estatística: Comparação entre os estímulos no mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. Colchetes representam $p < 0,05$. **Comparação entre os grupos:** Teste de *t*. * $p < 0,05$ em comparação à macrófagos M1 mantidos nas mesmas condições.

Em relação à produção de NO, também obtivemos que macrófagos M1 estimulados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* produzem quantidades significativamente maiores do que macrófagos M2. Mas após o estímulo com PMA, os dois tipos de macrófagos produzem quantidades similares (figura 4.14).

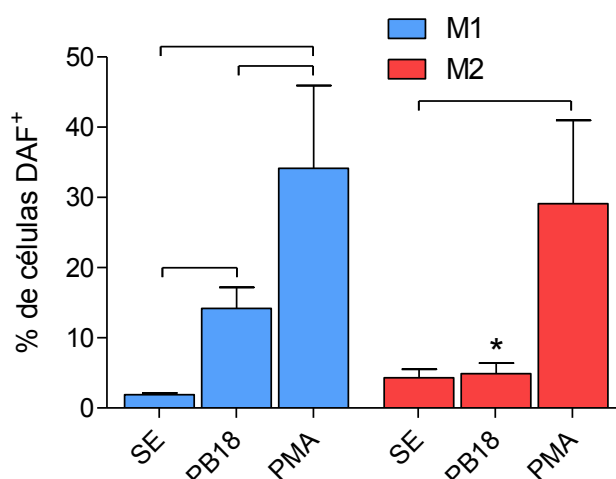


Figura 4.14 - Avaliação da produção de NO por citometria de fluxo. Macrófagos M1 e M2 diferenciados a partir de monócitos do sangue periférico foram mantidos sem estímulo ou estimulado por 1 hora com células leveduriformes de *P. brasiliensis* na proporção 1:1 ou com PMA (50ng/mL). **Análise estatística: Comparação entre os estímulos no mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas com pós-teste de Tukey. Colchetes representam $p < 0,05$. **Comparação entre os grupos:** Teste de *t*. * $p < 0,05$ em comparação à macrófagos M1 mantidos nas mesmas condições.

4.7. Avaliação da atividade de Arginase I

Também avaliamos a produção e atividade de arginase I em lisados de macrófagos M1 e M2 estimulados com células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Os resultados mostraram que macrófagos M2 apresentam maior atividade dessa enzima em comparação a macrófagos M1, mesmo em células não estimuladas. Além disso, observamos que o estímulo com células fúngicas levou a um aumento dessa atividade nos dois tipos de macrófagos (figura 4.15).

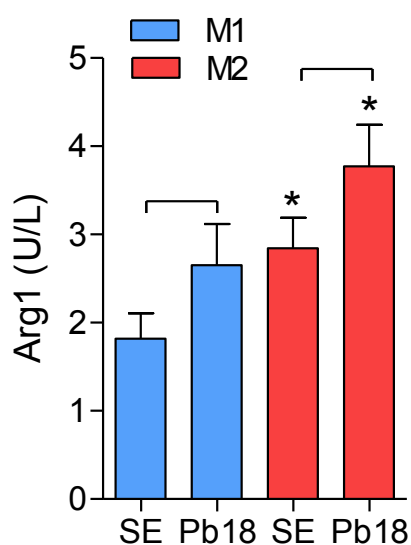


Figura 4.15 - Avaliação da atividade da arginase-I em culturas de macrófagos M1 e M2 estimulados ou não com leveduras de *Pb18* (1:1) por 4 horas. **Análise estatística: Comparação entre os estímulos no mesmo grupo:** Teste *t* pareado. Colchetes representam $p < 0,05$. **Comparação entre os grupos:** Teste de *t*. * $p < 0,05$ em comparação à macrófagos M1 mantidos nas mesmas condições.

4.8. Avaliação da diferenciação de linfócitos T CD3⁺ cocultivados com macrófagos M1 ou M2

Na etapa final de nosso estudo, avaliamos a participação de macrófagos M1 e M2 na indução da resposta imune adaptativa frente ao *P. brasiliensis*. Para isso, realizamos coculturas dos dois tipos de macrófagos com linfócitos T CD3⁺ autólogos e posteriormente analisamos a produção de citocinas características de respostas do tipo Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17) e Th22 (IL-22) pelos linfócitos T. Como pode ser observado na figura abaixo, as coculturas de macrófagos M1 na presença de leveduras do Pb18 induzem um aumento na frequência de células produtoras de IFN γ , tanto em linfócitos T CD3⁺CD4⁺ (Figura 4.16 A) e quanto linfócitos T CD3⁺CD8⁺ (Figura 4.16 B), o que não ocorre nas coculturas com macrófagos M2. Os resultados também mostraram aumento da frequência de células T CD3⁺CD4⁺ produtores de IL-17 na presença dos macrófagos M1 (figura 32C), e de linfócitos T CD3⁺CD8⁺IL17⁺ na presença de macrófagos M2 após o estímulo com leveduras do fungo (Figura 4.16 D).

Em relação da produção de IL-4, notamos que a presença dos macrófagos M2 aumenta a frequência de células positivas para essa citocina em

comparação aos macrófagos M1 (tanto T CD3⁺CD4⁺ quanto T CD3⁺CD8⁺ - figura 4.16 E e figura 4.16 F). Enquanto que nas coculturas com macrófagos M1 houve uma diminuição na frequência de células T CD3⁺CD8⁺IL4⁺ após o estímulo com o fungo (figura 4.16 E).

Na análise da produção de IL-22, observamos que tanto macrófagos M1 quanto macrófagos M2, na presença de leveduras do Pb18, induzem o aumento da produção dessa citocina em células T CD3⁺CD4⁺ (Figura 4.16 G), não havendo diferenças estatísticas na indução de linfócitos T CD3⁺ CD8⁺ produtores dessa citocina (figura 4.16 H).

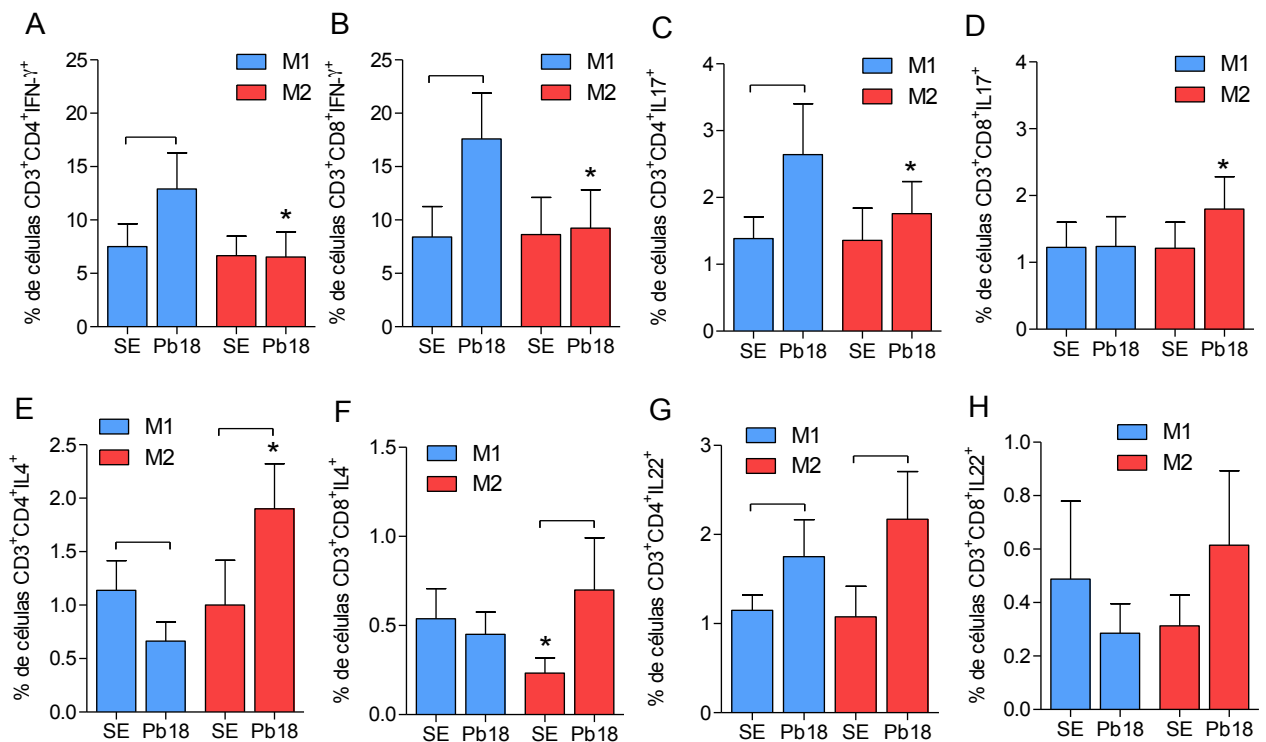


Figura 4.16 - Avaliação da produção de IFN-γ (A e B), IL-17 (C e D), IL-4 (E e F) e IL-22 (G e H) por linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e linfócitos T CD3⁺CD8⁺ na presença de macrófagos M1 e M2, mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18) por 5 dias. A análise de células positivas produtoras para as citocinas foi realizada por marcação intracelular pela técnica de citometria de fluxo. **Análise estatística: Comparação entre os estímulo no mesmo grupo: Teste *t* pareado. Colchetes representam *p*<0,05. **Comparação entre os grupos:** Teste de *t*. **p*<0,05 em comparação à macrófagos M1 mantidos nas mesmas condições.**

Além das citocinas descritas acima, também avaliamos se os macrófagos M1 ou M2 teriam a capacidade de induzir a diferenciação de células T com fenótipo de T regulatórias ($CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$). Como pode ser observado na figura abaixo a presença de macrófagos M2 com ou sem estimulação adicional de leveduras do Pb18, leva um aumento da frequência dessas células em comparação aos macrófagos M1 (Figura 4.17), sendo que o estímulo com as leveduras do fungo levam a um aumento significativo na porcentagem de células nas coculturas de macrófagos M2 (figura 4.17).

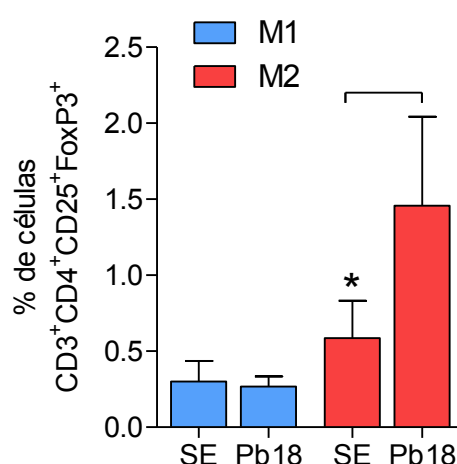


Figura 4.17 - Avaliação da frequência de células T $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ em coculturas de macrófagos M1 e M2, mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Pb18) por 5 dias. **Análise estatística:** **Comparação entre os estímulo no mesmo grupo:** Teste *t* pareado. Colchetes representam $p < 0,05$. **Comparação entre os grupos:** Teste de *t*. * $p < 0,05$ em comparação à macrófagos M1 mantidos nas mesmas condições.

4.9. Análise por imuno-histoquímica de biópsias de pacientes com paracoccidioidomicose

Terminados os testes *in vitro* com os macrófagos M1 e M2 de indivíduos saudáveis, realizamos análises dos cortes histológicos de lesões de pacientes com PCM. Observamos nos cortes teciduais de lesões da mucosa oral um infiltrado linfocitário localizado, principalmente, ao redor dos aglomerados de macrófagos e células gigantes, formando granulomas típicos, enquanto que nas lesões de linfonodos os linfócitos encontravam-se em grande número mas com distribuição

menos organizada (figuras 4.18 e 4.19). O número de linfócitos foi grande nos dois tipos de tecidos analisados, embora maior nas lesões de linfonodo (figuras 4.18 A e 4.19 A). Essas diferenças provavelmente são intrínsecas ao tipo de tecido analisado. Na figura 4.19 é possível observar que as células CD8⁺ se localizam ao redor de células gigantes ou próximas aos fungos nos linfonodos (figura 4.19 A) ou ao redor de granulomas na mucosa oral (figura 4.19 B).

Nas figuras 4.18 C e 4.19 C, analisamos a disposição e marcação dos linfócitos no linfonodo de pacientes sem PCM submetidos a tireoidectomia (controles). Os linfonodos se apresentavam livres de neoplasia e/ou qualquer outra patologia. De forma similar a análise das lâminas de pacientes com PCM, observamos um infiltrado com grande número de linfócitos, sendo estes com apresentação não organizada ao longo do tecido. Na análise da mucosa oral, foram selecionados casos de pacientes sem PCM com processo inflamatório leve, notamos uma marcação menor de linfócitos CD3⁺ (Figura 4.18 D), esse achado foi mais evidente na marcação para anti-CD8 (Fig. 4.19 D).

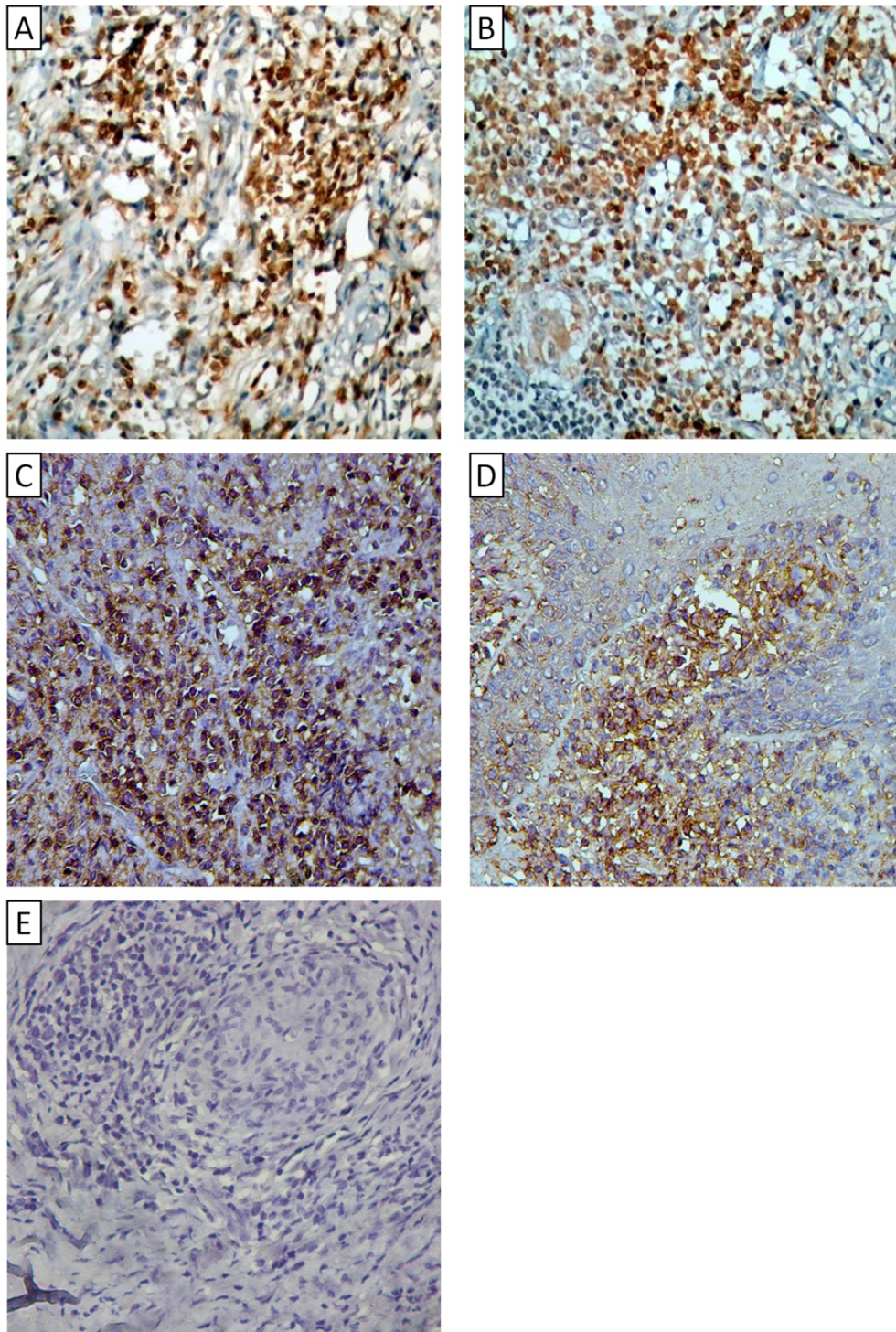


Figura 4.18 – Análise por imuno-histoquímica de cortes histológicos de linfonodo **(A)** e mucosa oral **(B)** de pacientes com PCM, linfonodo de indivíduo submetido à tireoidectomia **(C)** e mucosa oral de laminae com processo inflamatório leve sem correlação com PCM **(D)**. Marcação com anti-CD3 (marrom). **(E)** controle negativo (sem adição do anticorpo primário). Aumento 400 X.

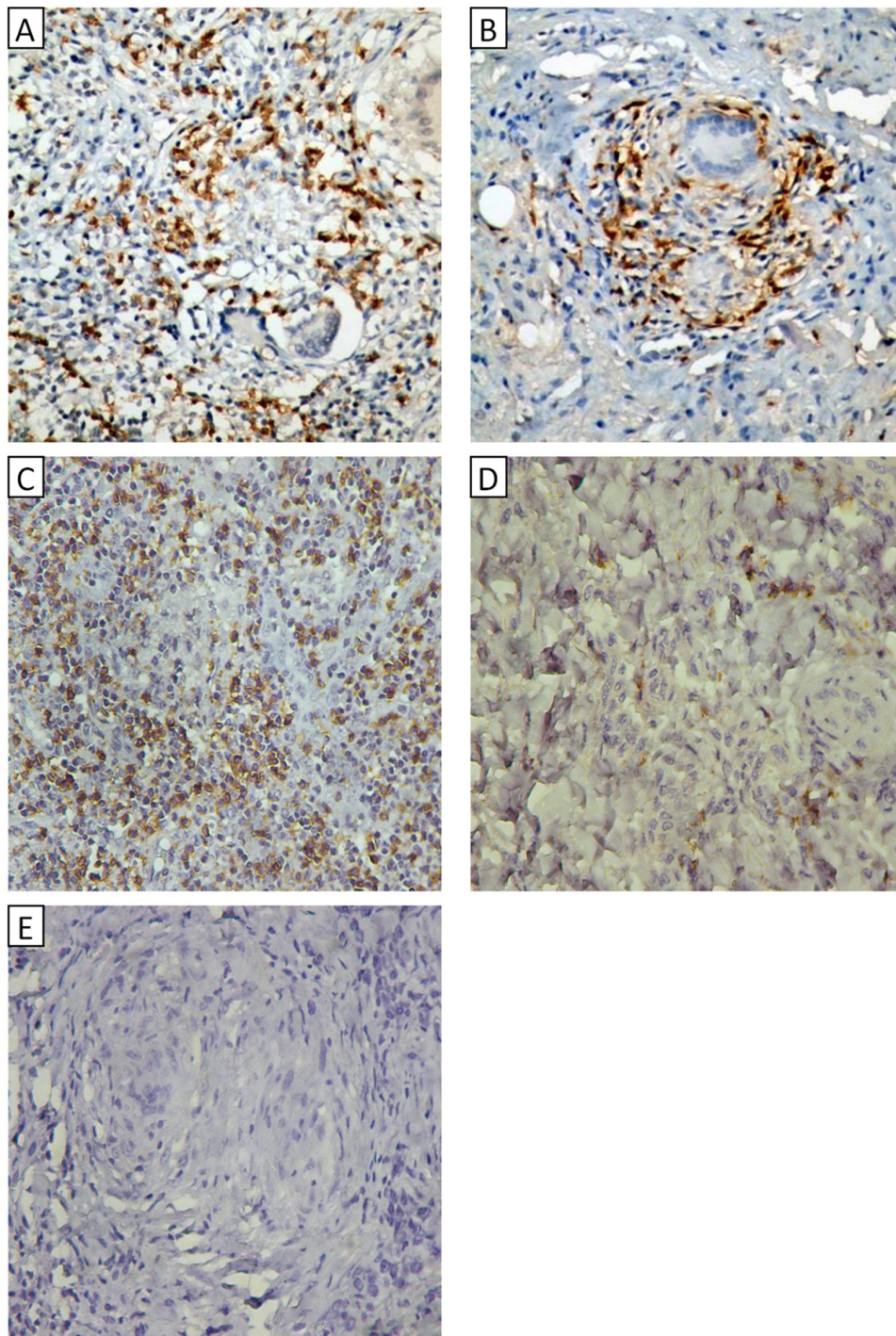


Figura 4.19 – Análise por imuno-histoquímica de cortes histológicos de linfonodo (**A**) e mucosa oral (**B**) de pacientes com PCM, linfonodo de indivíduo submetido à tireoidectomia (**C**) e mucosa oral de lâminas com processo inflamatório leve sem correlação com PCM (**D**). Marcação com anti-CD8 (marrom). (E) controle negativo (sem adição do anticorpo primário). Aumento 400 X.

O resultado da análise da marcação com anti-CD68 das lesões de mucosa oral (pacientes com a FC) e de linfonodos (pacientes com a FA) demonstrou que nos linfonodos, as células $CD68^{+}$ (macrófagos e células gigantes) foram

detectadas ao redor das leveduras (figura 4.20 A) de maneira desorganizada, enquanto que, nas mucosas, as células CD68⁺ estavam organizadas em granulomas compactos (figura 4.20 B). A contagem do número de células CD68⁺ nos diferentes cortes mostrou que quantidade de células CD68⁺ foi maior nos linfonodos do que nas mucosas, estando diretamente relacionada com a quantidade de fungos presentes no tecido que, frequentemente, foram vistos no interior de células gigantes.

Nas lâminas de pacientes sem PCM, observamos tanto no linfonodo quanto na mucosa uma diminuição da marcação para CD68, sendo essa organização celular menos compacta em relação a mucosa quando comparamos a mucosa de pacientes com PCM. Também observamos nessas lâminas a ausência de células gigantes (Figuras 4.20 C e 4.20 D).

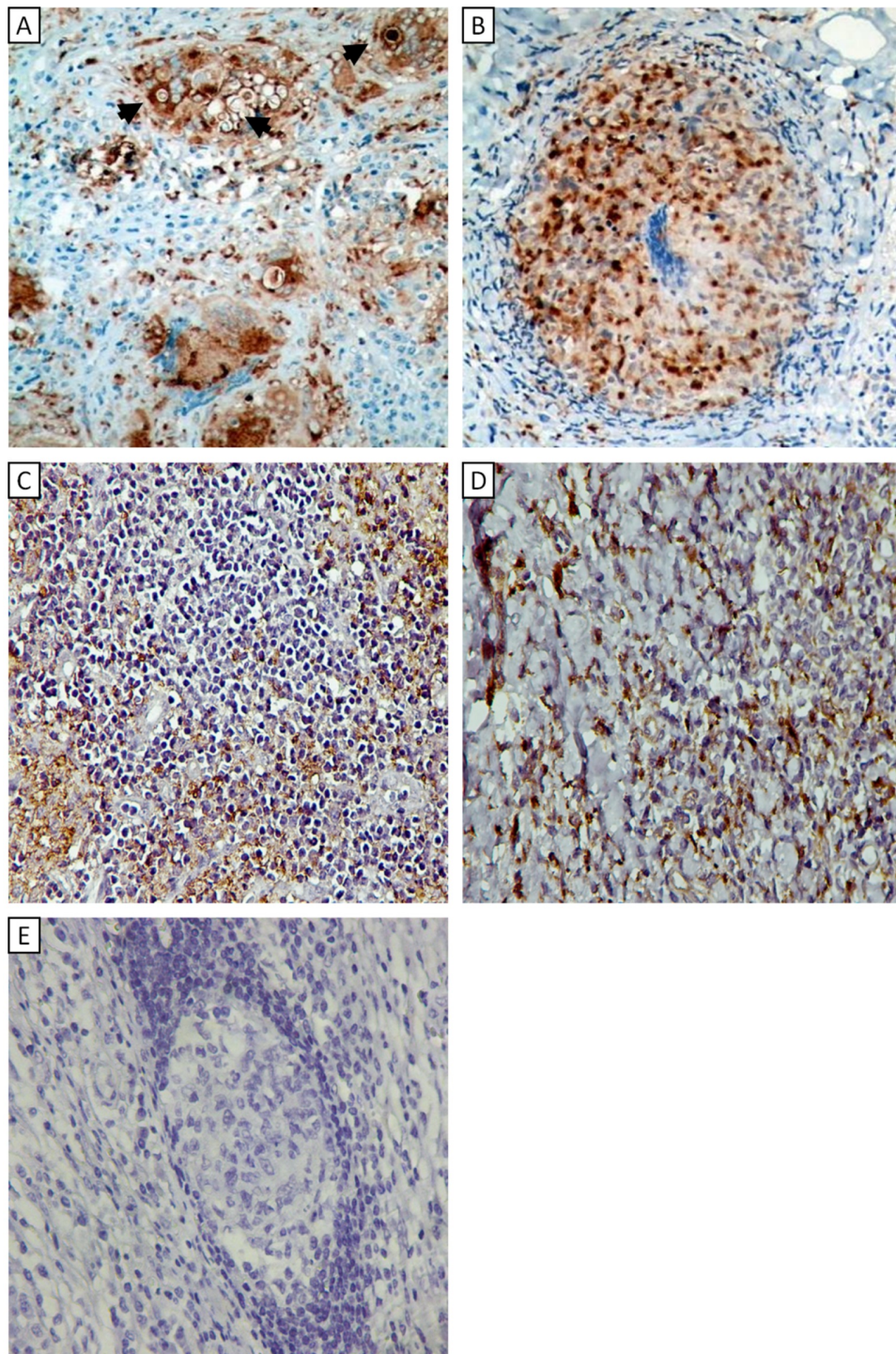


Figura 4.20 - Análise por imuno-histoquímica de cortes histológicos de linfonodo **(A)** e mucosa oral **(B)** de pacientes com PCM, linfonodo de indivíduo submetido à tireoidectomia **(C)** e mucosa oral de lamina com processo inflamatório leve sem correlação com PCM **(D)**. Marcação com anti-CD68 (marrom). **(E)** controle negativo (sem adição do anticorpo primário). Aumento 400 X.

Também avaliamos a marcação para citocinas caracteristicamente produzidas por macrófagos M1 (IL-12p70 e IL-23) e M2 (IL-10). A marcação para IL-12 foi escassa nos dois tecidos analisados e as poucas células positivas apresentavam morfologia típica de macrófagos (figura 4.21 A e 4.21 B). Também é possível observar que em lâminas controle (pacientes sem diagnóstico de PCM), a marcação para IL-12p70 foi muito fraca, com poucas células marcadas (figura 4.21 C e 4.21 D).

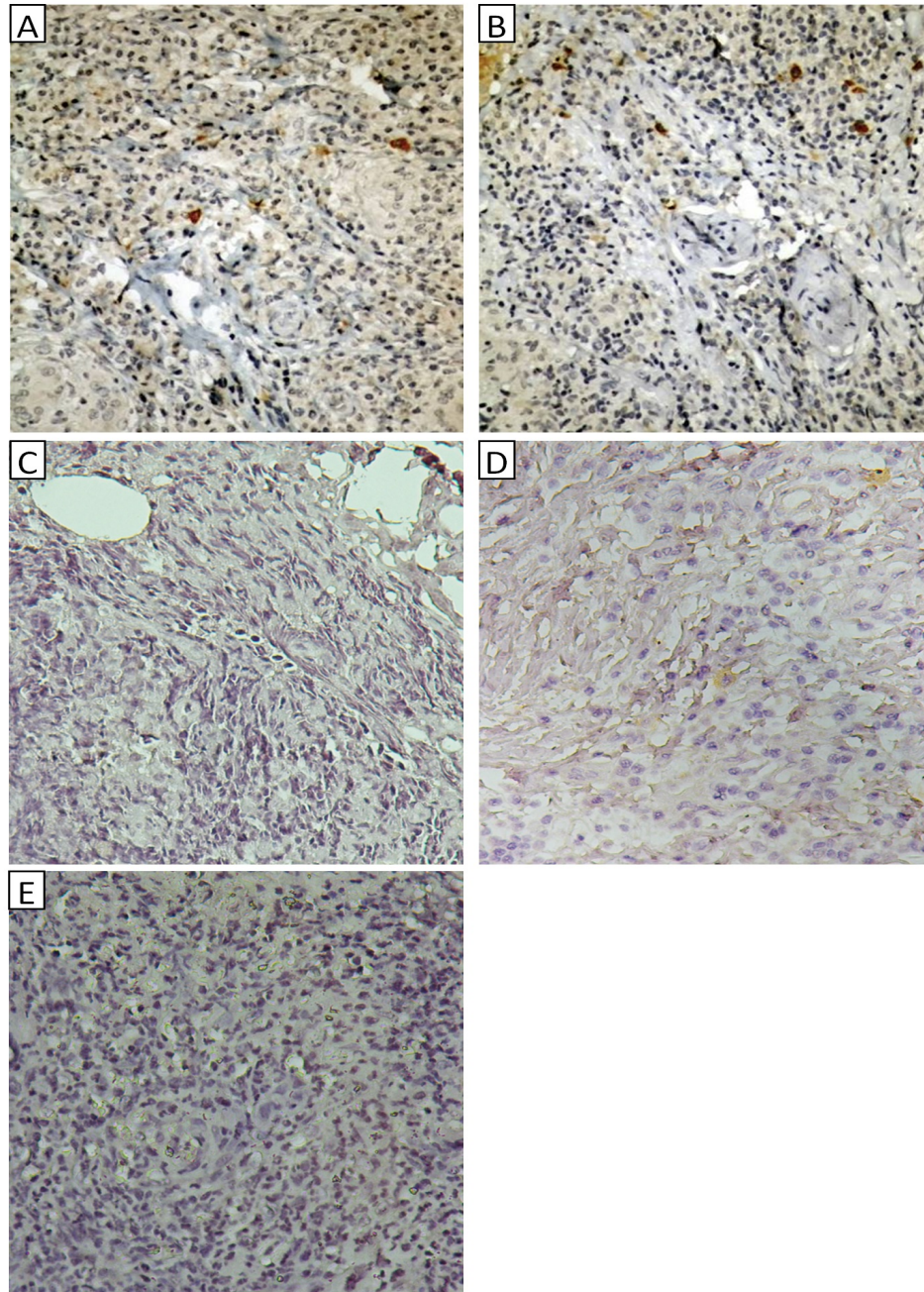


Figura 4.21- Análise por imuno-histoquímica de cortes histológicos de linfonodo **(A)** e mucosa oral **(B)** de pacientes com PCM, linfonodo de indivíduo submetido à tireoidectomia **(C)** e mucosa oral de laminae com processo inflamatório leve sem correlação com PCM **(D)**. Marcação com anti-IL12p70(marrom). **(E)** controle negativo (sem adição do anticorpo primário). Aumento 400 X.

Em relação à marcação para IL-23 observamos uma intensa marcação nas células inflamatórias em geral e macrófagos de permeio, tanto em linfonodos como em lesões de mucosa oral (figura 4.22 A e 4.22 B). Nas mucosas orais a expressão foi restrita a células gigantes, macrófagos e algumas células epiteliais (figura 4.22 B).

Nas lâminas controles (pacientes sem PCM) não foram observadas células positivas para IL-23 (figuras 4.22 C e 4.22 D).

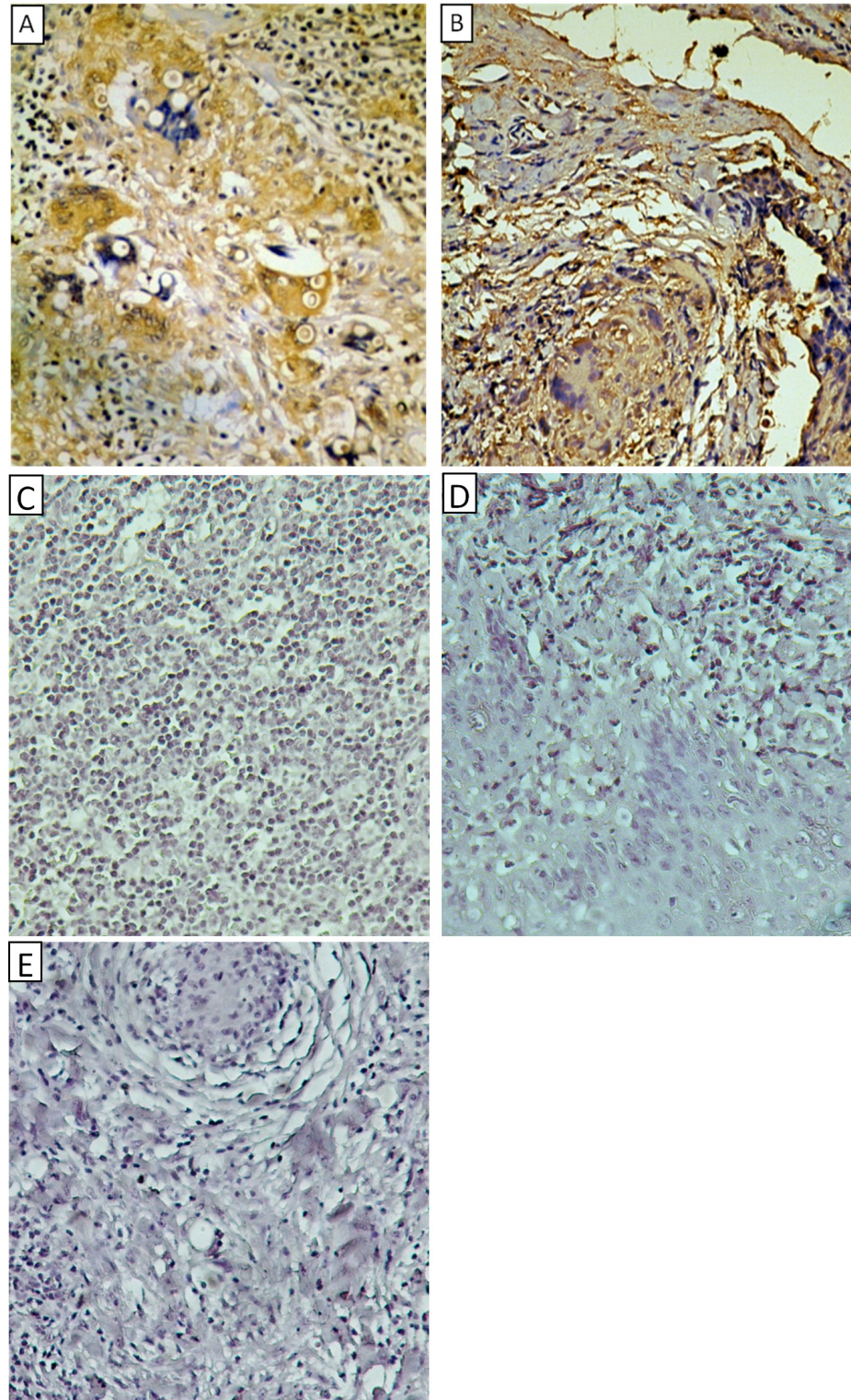


Figura 4.22 - Análise por imuno-histoquímica de cortes histológicos de linfonodo **(A)** e mucosa oral **(B)** de pacientes com PCM, linfonodo de indivíduo submetido a tireoidectomia **(C)** e mucosa oral de lamina com processo inflamatório leve sem correlação com PCM **(D)**. Marcação com anti-IL-23 (marrom). **(E)** controle negativo (sem adição do anticorpo primário) - Aumento 400X.

Em relação a IL-10, observamos que a marcação para esta citocina foi mais intensa nos linfonodos do que nas mucosas (figuras 4.23 A e 4.23 B respectivamente). Nos linfonodos muitas células positivas para IL-10 apresentaram características de linfócitos e/ou células gigantes (figura 4.23 A), enquanto que, nas mucosas, somente células com características de linfócitos foram positivas (figura 4.23 B).

Nas lâminas de pacientes sem PCM, observamos poucas células positivas para IL-10 no linfonodo e mucosa ao compararmos as lâminas dos pacientes com PCM (figuras 4.23 C e 4.23 D).

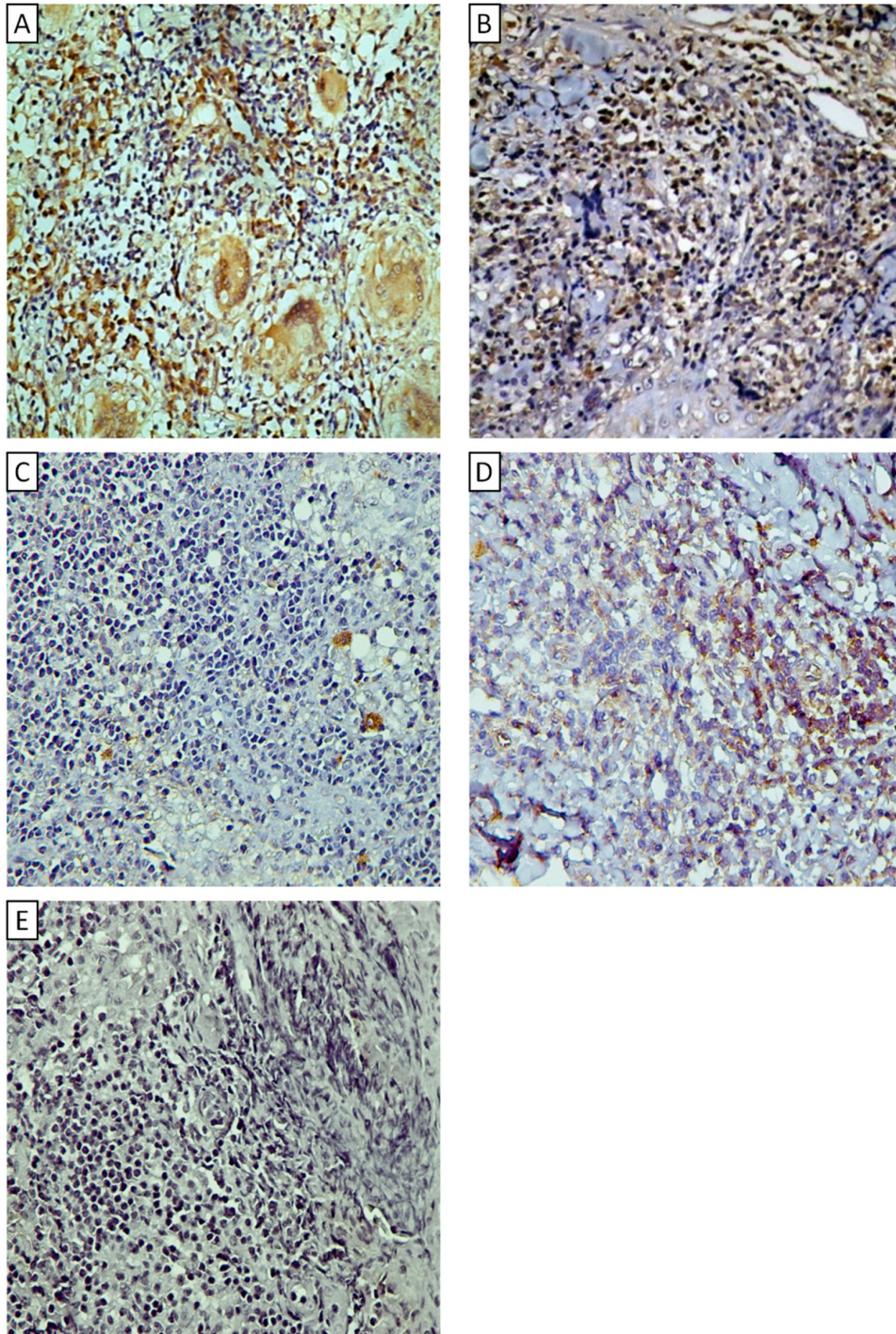


Figura 4.23 - Análise por imuno-histoquímica de cortes histológicos de linfonodo **(A)** e mucosa oral **(B)** de pacientes com PCM, linfonodo de indivíduo submetido a tireoidectomia **(C)** e mucosa oral de laminae com processo inflamatório leve sem correlação com PCM **(D)**. Marcação com anti-IL-10 (marrom). **(E)** controle negativo (sem adição do anticorpo primário). Aumento 400 X.

Também avaliamos outros marcadores específicos de macrófagos M1 (iNOS) e M2 (CD206). Observamos que tanto a marcação para CD206 (figura 4.24) quanto para a marcação para iNOS (figura 4.25), houve uma intensa marcação de células gigantes e macrófagos nos linfonodos (figuras 4.24 A - CD206 e 4.25 A - iNOS), enquanto que nas lesões de mucosa oral, a marcação foi mais esparsa, principalmente em células com morfologia de macrófagos (figuras 4.24 B e 4.25 B).

Nas lâminas com tecidos de pacientes sem PCM, observamos um número muito pequeno de células positivas para CD206 e iNOS, tanto no linfonodo (figuras 4.24 C e 4.25 C) quanto na mucosa (figuras 4.24 D e 4.25 D).

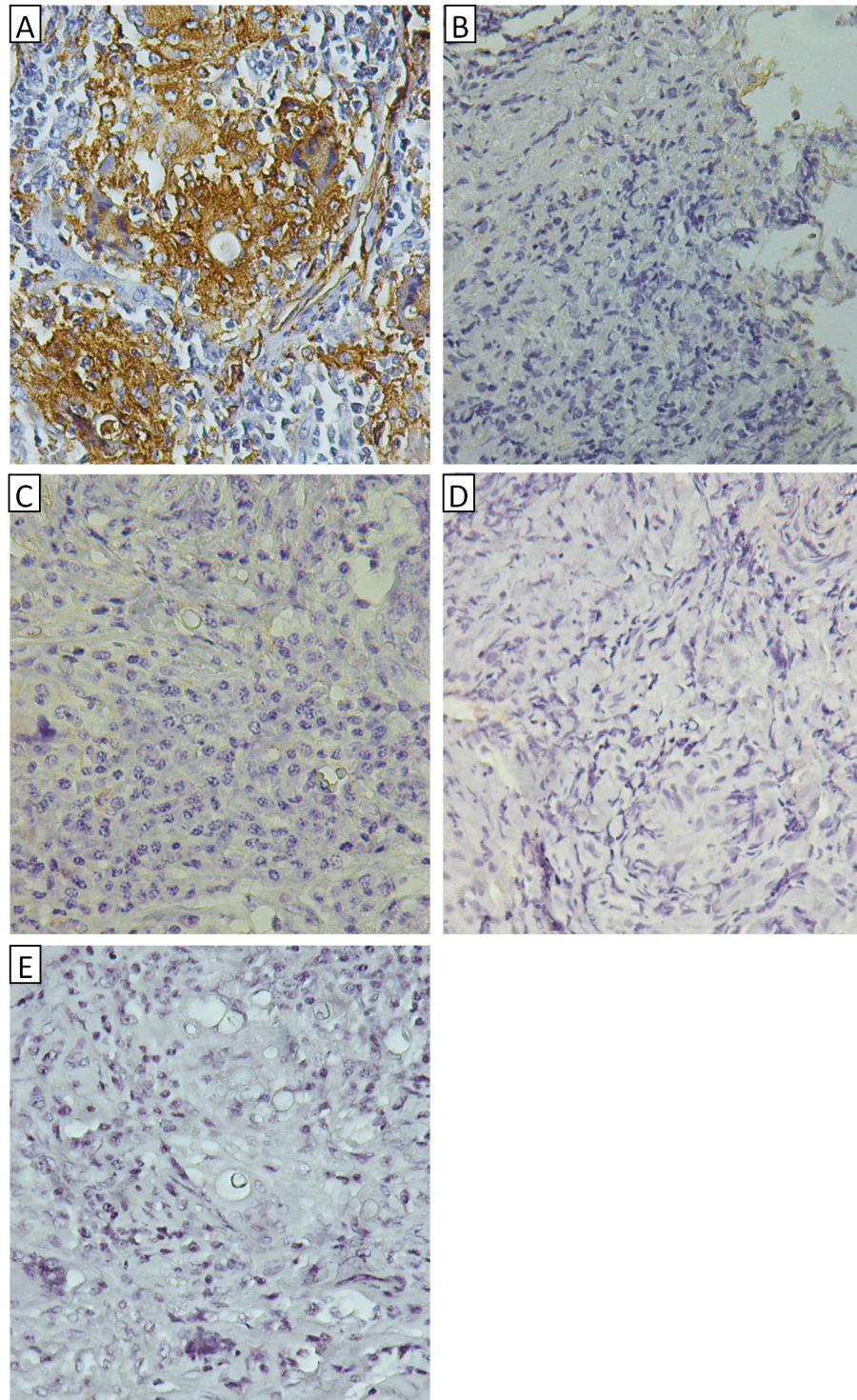


Figura 4.24 - Análise por imuno-histoquímica de cortes histológicos de linfonodo **(A)** e mucosa oral **(B)** de pacientes com PCM, linfonodo de indivíduo submetido a tireoidectomia **(C)** e mucosa oral de laminae com processo inflamatório leve sem correlação com PCM **(D)**. Marcação com anti-CD206 (marrom). **(E)** controle negativo (sem adição do anticorpo primário). Aumento 400 X.

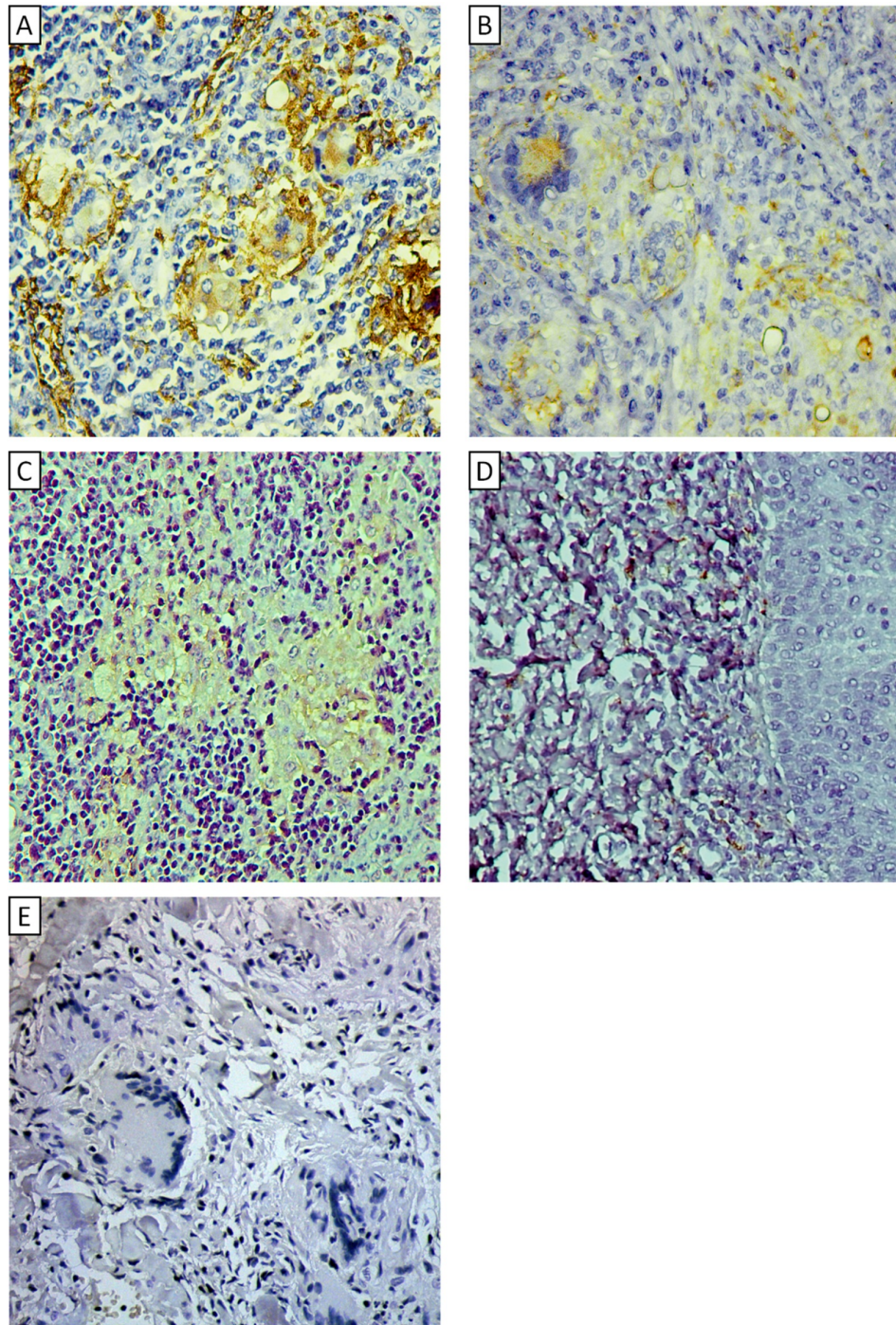


Figura 4.25 - Análise por imuno-histoquímica de cortes histológicos de linfonodo **(A)** e mucosa oral **(B)** de pacientes com PCM, linfonodo de indivíduo submetido a tireoidectomia **(C)** e mucosa oral de laminae com processo inflamatório leve sem correlação com PCM **(D)**. Marcação com anti-iNOS (marrom). **(E)** controle negativo (sem adição do anticorpo primário). Aumento 400 X.

Também avaliamos marcações para metaloproteínases de matriz MMP1 (Figura 4.26), MMP2 (Figura 4.27), MMP3 (Figura 4.28) e MMP9 (Figura 4.29) nos cortes de mucosa e linfonodos de pacientes com ou sem PCM.

Em relação à marcação para MMP-1, pudemos observar que nos cortes de linfonodos de pacientes com PCM houve uma marcação menos intensa (figura 4.26 A) em comparação aos cortes de mucosa oral (figura 4.26 B). Em ambos os casos a houve marcação de células inflamatórias distribuídas por todo o tecido, embora nos pacientes com a FC (mucosa oral) a marcação seja predominante em células gigantes. Nos cortes de pacientes sem PCM, também houve marcação para essa MMP, embora menos intensa do que observada nos pacientes com PCM (figura 4.26 C e 4.26 D).

A marcação para MMP-2, aparentemente foi mais intensa nos cortes de linfonodos quando comparados aos cortes de mucosa oral (figuras 4.27 A e 4.27 B respectivamente), com distribuição em todo o tecido. Novamente a marcação de tecidos de pacientes não relacionados à PCM foi menor (figura 4.27 C e 4.27 D).

Em relação à MMP-3 (figura 4.28) e MMP-9 (figura 4.29), observamos um padrão de marcação similar. Com intensa marcação de células gigantes tanto nos linfonodos (figuras 4.28 A e 4.29 A), quanto nas lesões de mucosa-oral (figura 4.28 B e 4.29 B). Nos tecidos de patologias não relacionadas à PCM houve marcação bastante discreta para as duas MMPs (figuras 4.28 C, 4.28 D, 4.29 C e 4.29 D).

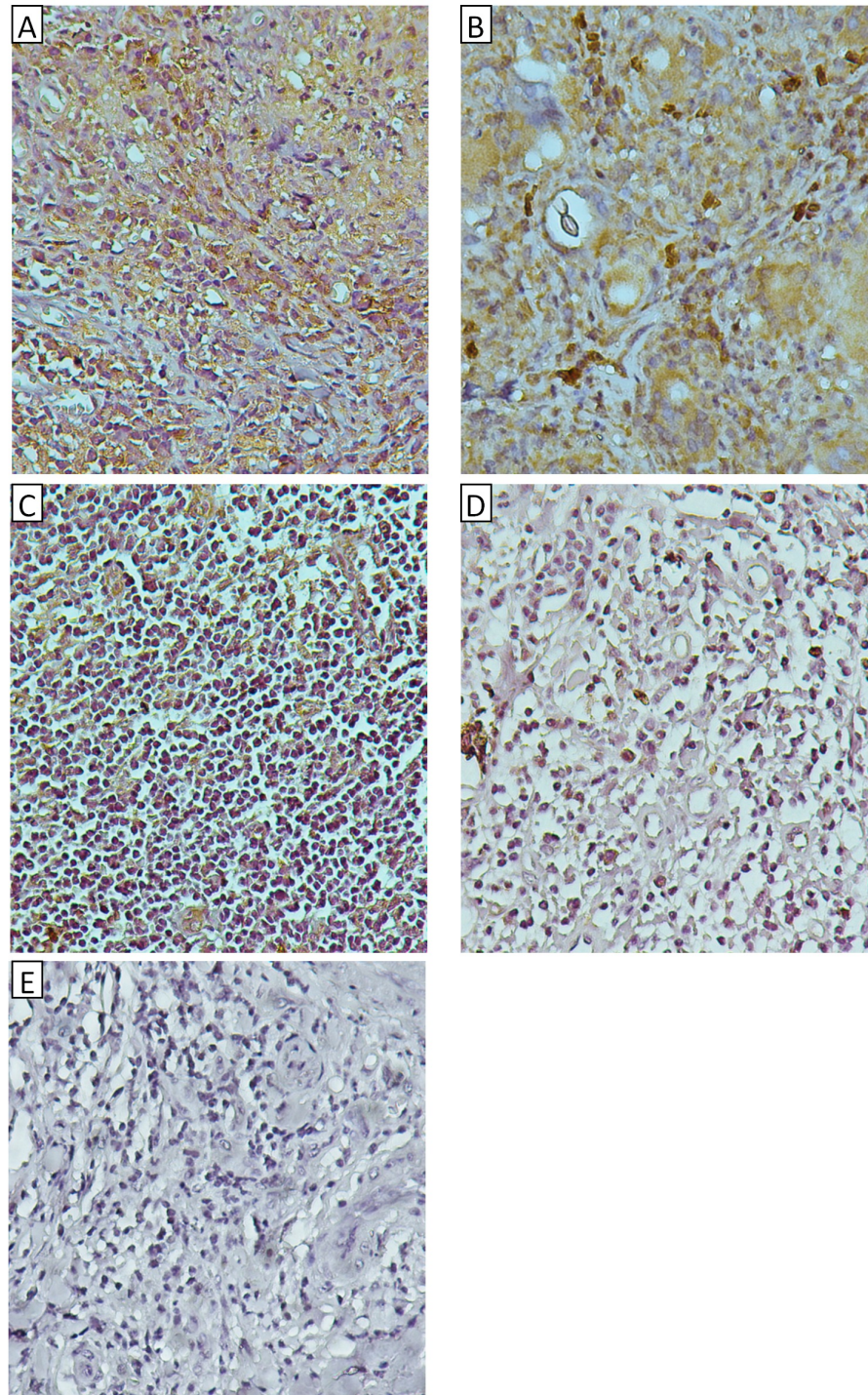


Figura 4.26 - Análise por imuno-histoquímica de cortes histológicos de linfonodo **(A)** e mucosa oral **(B)** de pacientes com PCM, linfonodo de indivíduo submetido a tireoidectomia **(C)** e mucosa oral de laminae com processo inflamatório leve sem correlação com PCM **(D)**. Marcação com anti-MMP-1 (marrom). **(E)** controle negativo (sem adição do anticorpo primário). Aumento 400 X.

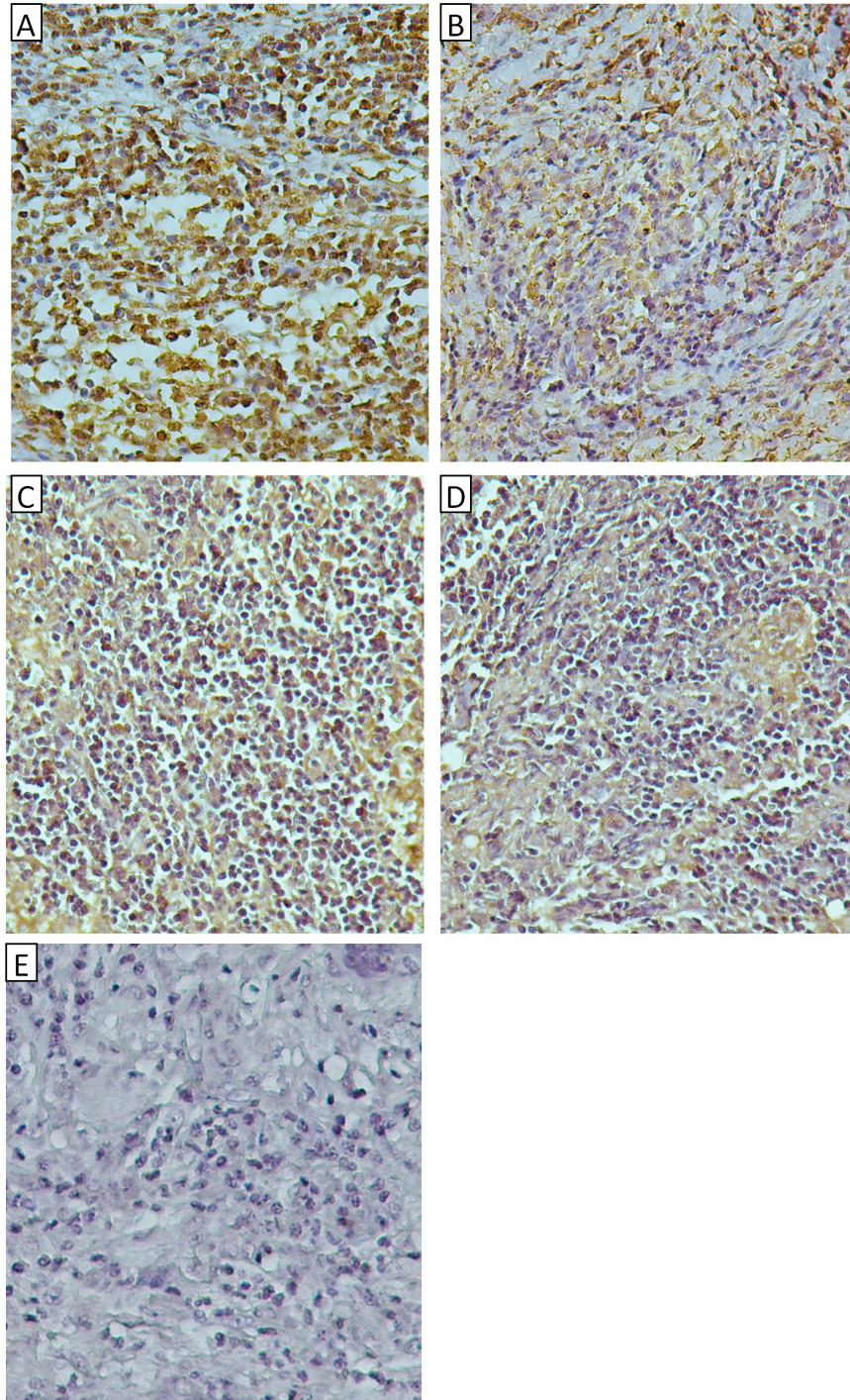


Figura 4.27 - Análise por imuno-histoquímica de cortes histológicos de linfonodo **(A)** e mucosa oral **(B)** de pacientes com PCM, linfonodo de indivíduo submetido a tireoidectomia **(C)** e mucosa oral de lamíνας com processo inflamatório leve sem correlação com PCM **(D)**. Marcação com anti-MMP-2 (marrom). **(E)** controle negativo (sem adição do anticorpo primário). Aumento 400 X.

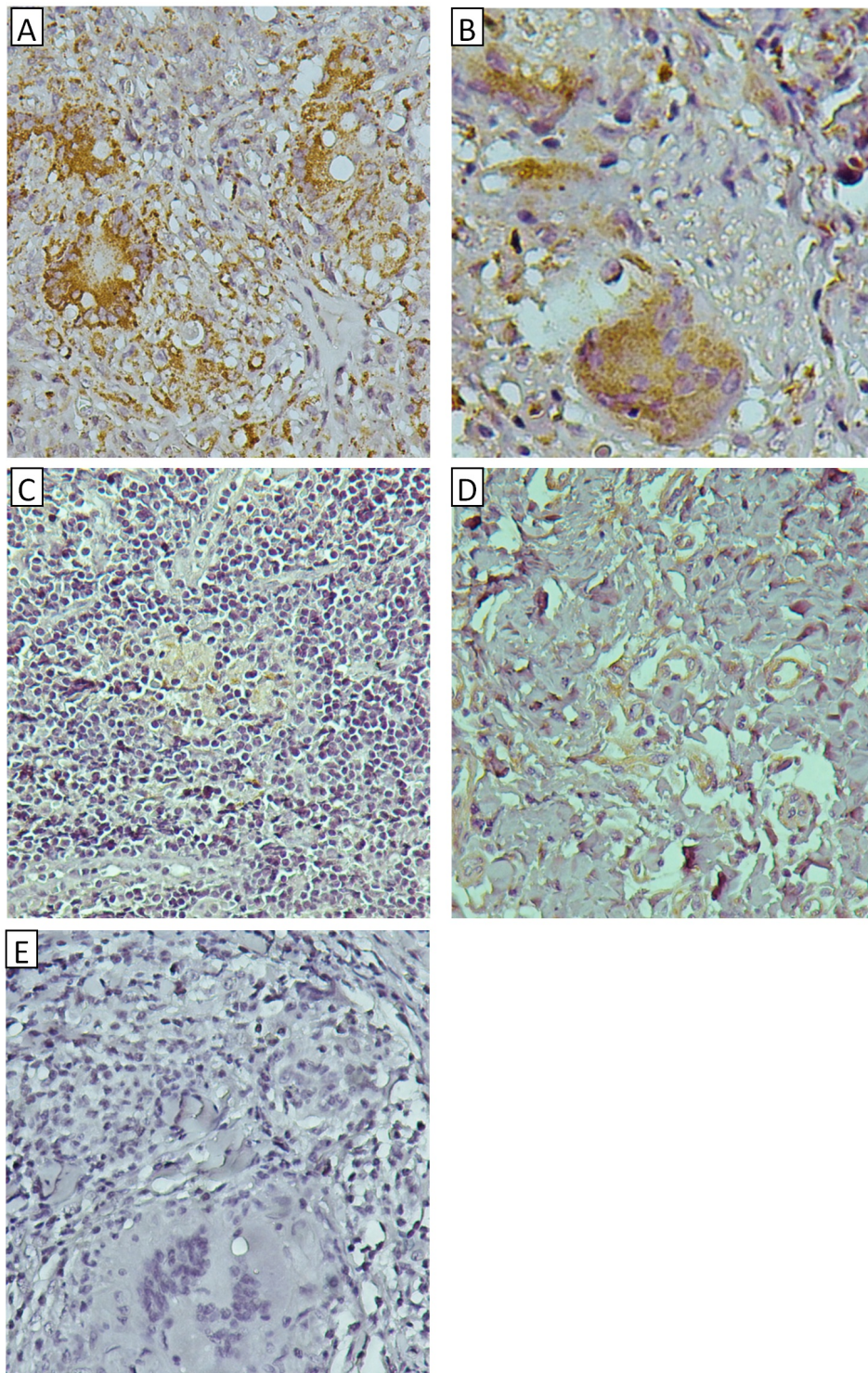


Figura 4.28 - Análise por imuno-histoquímica de cortes histológicos de linfonodo **(A)** e mucosa oral **(B)** de pacientes com PCM, linfonodo de indivíduo submetido a tireoidectomia **(C)** e mucosa oral de lamina com processo inflamatório leve sem correlação com PCM **(D)**. Marcação com anti-MMP-3 (marrom). **(E)** controle negativo (sem adição do anticorpo primário). Aumento 400 X.

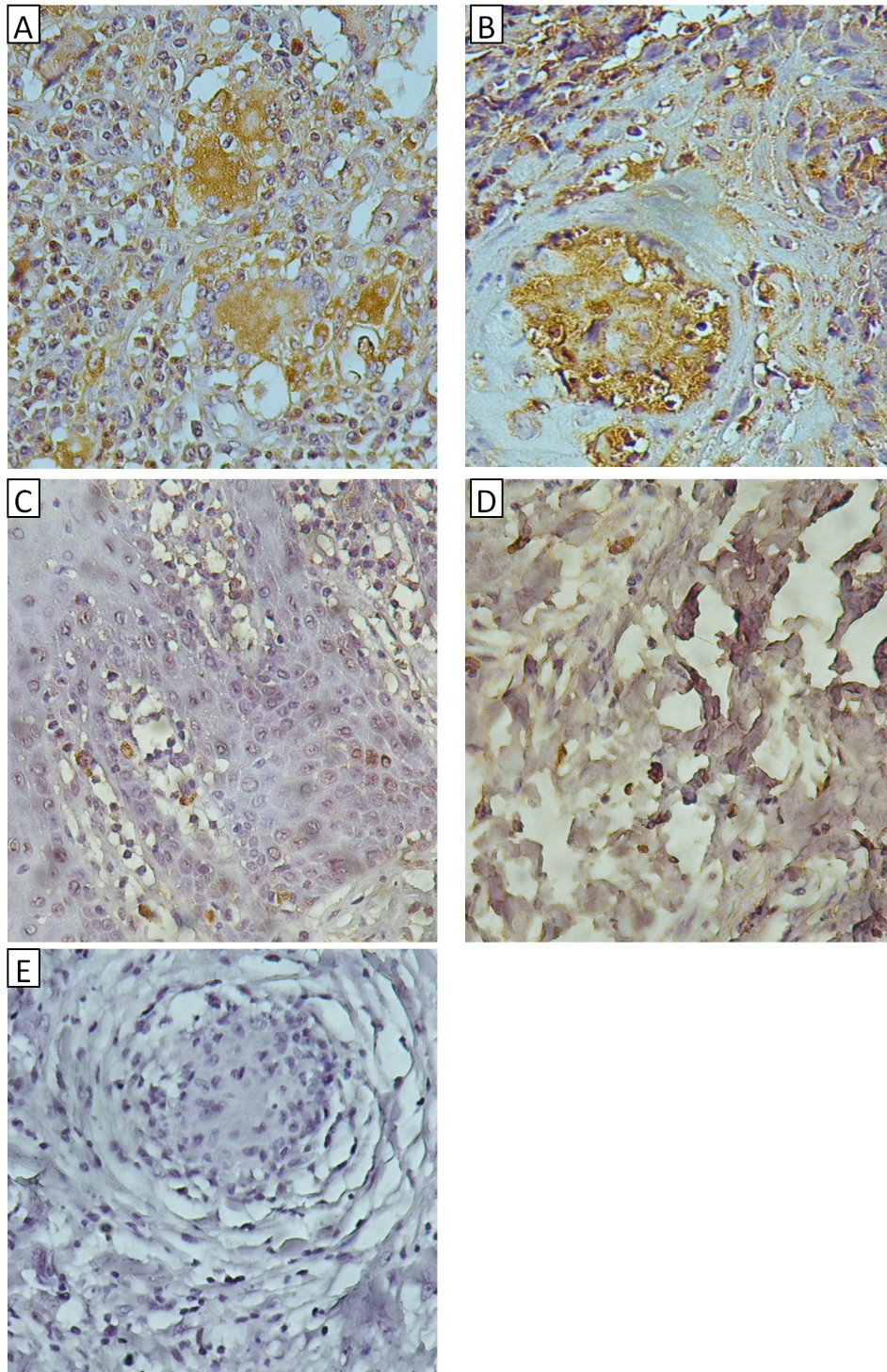


Figura 4.29 - Análise por imuno-histoquímica de cortes histológicos de linfonodo **(A)** e mucosa oral **(B)** de pacientes com PCM, linfonodo de indivíduo submetido a tireoidectomia **(C)** e mucosa oral de laminae com processo inflamatório leve sem correlação com PCM **(D)**. Marcação com anti-MMP-9 (marrom). **(E)** controle negativo (sem adição do anticorpo primário). Aumento 400 X.

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos mostram que a resposta imune inata que ocorre durante o contato inicial entre as células do hospedeiro e o patógeno é crucial para o desenvolvimento da resposta adaptativa [26]. Durante essa resposta inicial, macrófagos residentes nos tecidos e monócitos que atraídos pela resposta inflamatória migram do sangue periférico e também se diferenciam em macrófagos, desempenham papel de extrema importância [76, 77]. Essas células irão exercer diversas funções na resposta ao patógeno como a fagocitose e destruição de agentes infecciosos, liberação de mediadores inflamatórios, além de atuação no processamento e apresentação de antígenos [48, 77, 78].

Como mencionado, estudos recentes têm demonstrado a existência de diferentes populações de macrófagos, que podem afetar de maneira distinta a resposta imune adaptativa. Existem basicamente dois tipos de macrófagos polarizados, geralmente chamados de macrófagos M1 e M2, embora alguns pesquisadores argumentem contra tal classificação, uma vez que estas células apresentam grande plasticidade fenotípica [79].

A fenotipagem das células demonstrou que em nosso modelo, a diferenciação resultou em macrófagos com características similares àquelas descritas na literatura [48], sendo que macrófagos M1 apresentaram maior expressão de moléculas de MHC II, CD80 e CD86, enquanto que macrófagos M2 apresentaram maior expressão de moléculas associadas à fagocitose (CD206, CD36) e CD163.

Nossos resultados apontam um papel diferencial para os macrófagos M1 e M2 na resposta ao *P. brasiliensis*. Os resultados dos experimentos de formação de granuloma *in vitro* indicam que macrófagos M1 formam granulomas maiores e com maior número de células ao redor de esferas recobertas com antígenos derivados de *P. brasiliensis* quando comparados a macrófagos M2. Nossos dados, são similares aqueles descritos para granulomas encontrados em doenças causadas por micobactérias [80, 81]. Na tuberculose, modelos *in vitro* revelam que os macrófagos M1 induzem a formação de granulomas compactos, enquanto que macrófagos M2 inibem essa formação [80]. Além disso, a análise histológica de tecidos infectados pelo *M. tuberculosis* mostra que macrófagos M2 são predominantes em granulomas necróticos [80]. Nossos resultados confirmam trabalhos anteriores e mostram que lesões de pacientes com a forma crônica da doença apresentam granulomas bem

formados (compactos) e poucas células fúngicas. É interessante notar que os macrófagos e células gigantes presentes nessas lesões produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-12p70 e IL-23, além de expressarem iNOS, mas apresentam marcação muito tênue para IL-10. Por outro lado, nas lesões de pacientes com a forma aguda (linfonodos) houve uma forte marcação para IL-10 e CD206 (normalmente associados a macrófagos M2), além de que os granulomas não se formam de maneira típica, mostrando-se frouxos e apresentando um grande número de células fúngicas. Em trabalho recente, Carli et al. (2015) mostraram que lesões causadas por *P. brasiliensis* apresentando granulomas frouxos apresentam macrófagos com características de M2, expressando a molécula de CD163 [67].

Observamos que macrófagos e células gigantes de lesões de linfonodo apresentaram forte marcação para iNOS, normalmente associada a macrófagos M1, e que nos experimentos *in vitro* o estímulo com PMA induziu uma produção de NO nos macrófagos M2 similar àquela produzida por macrófagos M1. Embora o NO seja importante para a destruição do fungo (principalmente no modelo murino) [34], foi demonstrado que a produção de níveis muito elevados desse mediador leva à supressão da resposta imunológica e suscetibilidade à doença [82].

Em relação aos testes funcionais, observamos que macrófagos M1 apresentam uma maior capacidade de produção de H₂O₂ e de NO (óxido nítrico), após o estímulo com células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Enquanto que macrófagos M2 apresentaram maior atividade de arginase quando comparados aos macrófagos M1. A expressão elevada de arginase aumenta a hidrólise da L-arginina em uréia e ornitina diminuindo por sua vez a produção de NO [67]. Dessa forma, a menor produção de NO pelos macrófagos M2 *in vitro* após estímulo com o fungo, pode ser explicada pela sua maior produção de Arginase I, uma vez que a arginase compete com a iNOS pela L-arginina.

Nossos resultados também mostraram que macrófagos M2 apresentam capacidade fagocítica muito superior a observada nos macrófagos M1. Os resultados de caracterização fenotípica mostraram que macrófagos M2 apresentam uma maior expressão de todos os receptores associados à fagocitose (CD206, CD163, CD205, CD209, CD36 e CD16). Dessa forma, a maior expressão desses receptores poderia explicar a maior capacidade fagocítica observada nesse tipo celular. Além disso, alguns estudos já mostraram que citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 podem induzir um aumento na capacidade fagocítica de monócitos e

macrófagos [83], sendo que a maior produção dessa citocina foi observada nos macrófagos M2. É importante destacar que a opsonização das células fúngicas levou a um aumento na capacidade fagocítica de macrófagos M1, mas não interferiu nessa função dos macrófagos M2. Por outro lado, a utilização do anticorpo bloqueador de CD206 (receptor de manose) demonstrou que esse receptor é importante para a fagocitose nos macrófagos M2, mas não para os macrófagos M1. Dessa forma, fica evidente que a fagocitose por esses dois tipos celulares está associada a diferentes tipos de receptores.

Tendo em vista a maior produção de H_2O_2 e NO por macrófagos M1 após o estímulo com o fungo, esperávamos observar uma maior atividade fungicida por esse tipo celular. Contudo, nossos resultados mostraram o contrário. Macrófagos M1 só apresentaram capacidade fungicida similares aos macrófagos M2, quando as leveduras do fungo foram opsonizadas, fato que, como mencionado, também levou a um aumento na capacidade fagocítica desses macrófagos. É interessante notar que quando analisamos a fagocitose de células leveduriformes não opsonizadas, encontramos um número muito maior de macrófagos M2 (em média 25% das células) em comparação a macrófagos M1 (aproximadamente 10%) fagocitando os fungos (2,5x). Já nos testes de atividade fungicida, macrófagos M1 foram capazes de matar em média 40% dos fungos, enquanto que macrófagos M2 mataram aproximadamente 65% dos fungos (1,6x). Dessa forma, proporcionalmente, um número menor de macrófagos M1 é capaz de matar um número maior de leveduras. Isso poderia indicar que grande parte das leveduras do fungo fagocitados por macrófagos M2 não são eliminadas, podendo esse ser um mecanismo envolvido na disseminação do fungo.

Nossos resultados também mostraram que macrófagos M1 e M2 apresentam diferentes padrões de produção de MMPs, citocinas e expressão de receptores de reconhecimento padrão (PRRs).

Em relação às MMPs, nossos dados mostraram que nas lesões de pacientes com PCM existe uma grande produção dessas enzimas tanto nas de pacientes com a FC quanto na FA da doença. Já os experimentos *in vitro* mostraram que macrófagos M1 em geral produzem maiores quantidades dessas enzimas em comparação aos macrófagos M2, particularmente de MMP-1 e MMP-9. As MMPs compreendem uma grande família de endopeptidases contendo zinco, dependentes de cálcio, que são responsáveis pela degradação e remodelação de tecidos da

matriz extracelular (MEC), incluindo colágeno, elastina, gelatina, glicoproteínas da matriz, e proteoglicanos. A degradação da MEC é comumente associada como a principal função da MMP-9 em diversos processos biológicos. Além da degradação da MEC, a MMP-9 também têm sido reportada na degradação e modificação de atividades de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e inibidores de proteínas [84, 85]. A MMP-3 por sua vez (também conhecida como estromelisina) ativa MMP-1 (conhecida como a collagenase-1) e cliva uma ampla gama de proteínas da matriz [86]. Na PCM experimental a produção de MMPs (MMP-2 e MMP-9) foi demonstrada tanto em camundongos suscetíveis quanto resistentes e associada a disseminação do fungo [65]. A maior produção de MMPs (principalmente MMP-9) por macrófagos M1 dessa forma poderia estar relacionada a um remodelamento tecidual que se mantido de forma crônica poderia apresentar um efeito deletério, levando à fibrose tecidual.

Em relação aos receptores envolvidos no reconhecimento de PAMPs fúngicos e ativação de macrófagos, observamos que macrófagos M1 apresentam maior expressão de dectina-1 e menor expressão de TLR2 e TLR4 quando comparados a macrófagos M2. Após a exposição ao fungo, a expressão de dectina-1 diminui nos macrófagos M1. Essa diminuição na expressão pode ser um indício de internalização após sua utilização para a sinalização [87]. A dectina-1 tem sido descrita como fundamental para o reconhecimento de PAMPs fúngicos e para a ativação de células com caráter pró-inflamatório, induzindo uma maior produção de citocinas e de reativos intermediários de oxigênio e de NO [28, 45, 88]. No modelo experimental da PCM, diversos artigos recentes têm demonstrado que a dectina-1 é de extrema importância para o reconhecimento do fungo por macrófagos e para indução de resposta adaptativa que leva a resistência à infecção (Th1 e Th17) [89-91]. Dessa forma, camundongos deficientes para dectina-1 apresentam doença mais grave e disseminada e consequente maior taxa de mortalidade, associada à alta produção de IL-10 [91].

Por outro lado, nossos resultados mostram que a expressão de TLR-2 e TLR-4 foi maior em macrófagos M2. Diversos artigos mostram que o TLR-2 apresenta um papel de grande importância na indução de expansão e no controle das funções de células T regulatórias [92], e na indução da produção de IL-10 [93, 94]. Na infecção experimental por *C. albicans*, foi demonstrado que a ausência do TLR-2 (nocaute gênico) induz resistência à infecção pelo fungo, e que essa

resistência pode ser associada à diminuição do número de células T regulatórias naturais e consequentemente da produção de IL-10 [95]. No modelo experimental da PCM Loures *et al* (2009) mostraram que camundongos deficientes para TLR2 apresentam resposta inflamatória descontrolada devido à diminuição no número de células T regulatórias, associada com um aumento da resposta Th17. Por outro lado, animais deficientes para TLR4 foram caracterizados por uma resposta inflamatória diminuída, associada à expansão do número de células regulatórias [42, 43].

Nossos dados também mostram que após o reconhecimento das leveduras, macrófagos M1 e M2 apresentam um perfil diferencial na produção de citocinas, que de maneira geral coincidem com os descritos na literatura. Dessa forma, notamos nos macrófagos M1 um predomínio de produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12p70, TNF- α e IL-6 enquanto que os macrófagos M2 apresentam uma grande produção de IL-10 e de IL-1 β .

A maior produção de IL-10 por macrófagos M2 parece ser a principal responsável pelas características apresentadas por esse tipo de células. Sabe-se que a IL-10 exerce diversos efeitos sobre os macrófagos, dentre os quais o aumento da capacidade fagocítica [96, 97]. Entretanto, a presença da IL-10 também reduz a habilidade desses fagócitos na destruição dos patógenos por eles fagocitados, levando a uma diminuição da produção de ânion superóxido e NO [83, 98, 99]. A IL-10 também diminui a expressão do TLR4 [100] e aumenta a expressão de CD14, CD16, CD64 e CD163 [101].

Em conjunto, a expressão diferencial de PRRs e a produção de padrões distintos de citocinas poderiam explicar os resultados obtidos relacionados à indução de diferenciação de linfócitos T, já que os macrófagos, além de seu papel efetor na resposta inata, apresentam a capacidade de apresentar antígenos para linfócitos T. Nossos resultados mostraram que macrófagos M1 estimulados com leveduras de *P. brasiliensis* apresentam maior expressão de moléculas associadas à apresentação de antígenos, como MHC de classe II e de moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86).

Observamos que macrófagos com características inflamatórias (M1) induziram uma frequência maior de células T (CD4⁺ e CD8⁺) produtores de IFN- γ e células T (CD4⁺) produtoras de IL-17. Por outro lado, observamos que macrófagos M2 induziram uma maior frequência de linfócitos produtores de IL-4, além de

linfócitos com fenótipo de células regulatórias (FoxP3⁺). Nossos dados também mostraram que ambos os subtipos de macrófagos (M1 e M2) induzem uma frequência elevada de células T (CD4⁺ e CD8⁺) produtoras de IL-22.

Como mencionado na PCM, o IFN- γ (e a resposta Th1) está relacionado à resistência a doença, tanto na infecção experimental como na humana [13, 16-18]. O IFN- γ atua por meio da ativação de macrófagos, aumentando o seu metabolismo oxidativo, gerando assim intermediários reativos de oxigênio, como o H₂O₂ [35, 102], e de nitrogênio, principalmente o NO [34, 82, 103], favorecendo a destruição do *P. brasiliensis*.

Macrófagos M1 também foram mais efetivos na indução de IL-17 por linfócitos T CD4⁺. Após a sua descrição, a participação das células Th17 na resposta imunológica a doenças causadas por fungos começou a ser bastante estudada, e vem sendo apontada como uma das principais citocinas que promovem a resistência a esses agentes patogênicos [26, 104-106]. No modelo experimental da infecção causada pelo *Pneumocystis jiroveci*, a produção de IL-17 e IL-23, foi descrita como sendo importante na resposta protetora [107]. Na infecção experimental por *H. capsulatum*, Heninger et al (2006) [108] mostraram a presença de células produtoras de IFN- γ e IL-17 no granuloma formado em resposta ao fungo e que a IL-17 é necessária para a sua formação. Na infecção pelo *C. neoformans*, a presença de IL-23 e de IL-17 foi relacionada à resistência à doença por meio da indução de citocinas inflamatórias como IL-1 e IL-6 [109]. No modelo experimental da PCM, alguns trabalhos recentes demonstram que a produção de IL-17 (produzida por linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺) está envolvida na resistência à doença [89, 91]. É interessante notar que nesses trabalhos a produção de IL-17 foi associada à ativação de macrófagos (M1) por meio da dectina-1 e TLR-4 [89, 91]. Na paracoccidiodomicose humana poucos trabalhos descrevem o papel da IL-17 e de citocinas relacionadas às células Th17. Já foi descrito que nas lesões de mucosa e pele de pacientes com a FC da PCM, existe um grande número de células produtoras dessa citocina [110]. Além disso, em trabalho realizado por nosso grupo observamos que células Th17 são predominantes nos indivíduos com a FC da doença [19].

Neste trabalho observamos, que enquanto linfócitos cocultivados com macrófagos M2 estimulados com células fúngicas apresentaram aumento na produção de IL-4, as coculturas com macrófagos M1 levaram a diminuição

significativa na porcentagem de linfócitos positivos para essa citocina. A IL-4 é a citocina que caracteriza a resposta Th2 tem importante função na inibição da resposta Th1 e atua na resposta humoral, principalmente induzindo a produção de anticorpos das classes IgG4 e IgE [111], caracteristicamente produzidos nas formas mais graves da paracoccidioidomicose [15, 112]. Camundongos suscetíveis à infecção pelo *P. brasiliensis* (B10.A) produzem quantidades elevadas de IL-4, ao lado de outras citocinas Th2 como IL-5, IL-10 e TGF- β [12, 113]. Pina *et al.* (2004) [114] mostraram que camundongos C57BL/6 deficientes na produção de IL-4 são mais resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis*, demonstrando que a deficiência dessa citocina leva a um aumento da produção de IFN- γ e diminuição da carga fúngica nos pulmões dos camundongos, associado a uma diminuição da produção de IL-5 e IL-10. Dessa forma, aparentemente a presença de células M1 nas coculturas apresenta um papel inibitório na diferenciação de células Th2, provavelmente devido ao aumento na produção de IFN- γ .

Outro fato interessante foi o de que macrófagos M1 e M2 apresentam capacidade similar na diferenciação de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-22. A IL-22 foi primeiramente associada às células Th17, mas recentemente foram descritas células capazes de produzir grandes quantidades de IL-22, sem contudo produzirem IL-17. Essas células produtoras de IL-22 (denominadas de Th22) aparentemente desempenham papel importante na resposta inflamatória observada no epitélio em algumas doenças como a psoríase [115]. A IL-22, é fundamental na defesa contra agentes bacterianos intestinais [116, 117], contra bactérias pulmonares gram-negativas, tais como *Klebsiella pneumoniae* [118, 119] e contra o fungo *C. albicans* [120], sendo importante para a regulação da resposta tecidual durante a inflamação. As células Th22 podem ser importantes na resposta imunológica a fungos, visto sua participação na resposta que ocorre nas mucosas e na superfície dos epitélios [121].

Além disso, nossos dados também mostram os macrófagos M2 envolvidos na polarização de linfócitos com características regulatórias (células CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺). Como mencionado, a diferenciação de células Treg já foi relacionada à sinalização via TLR2 [92], cuja expressão foi maior nas células M2. Células Treg podem suprimir a proliferação celular e resposta imune por meio de vários mecanismos, incluindo a produção de citocinas, o contato célula-célula e a síntese de metabolitos imunossupressores [122]. Em um trabalho de nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que a ativação das células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺)

contribuía na supressão da resposta immune durante a infecção pelo *P brasiliensis*, principalmente pela produção de IL-10 e TGF- β [123].

Em conjunto, nossos dados confirmam aqueles descritos na literatura. O fato de que alguns resultados obtidos em nosso trabalho serem incompatíveis com dados anteriormente publicados pode indicar que macrófagos podem mudar de perfil M1 e M2 rapidamente. Isso pode ser evidenciado na análise dos fenótipos das células estimuladas por 24 horas com o fungo, que muitas vezes se tornam similares nos dois tipos de células (embora muitos parâmetros se mantenham inalterados). Essa plasticidade em macrófagos já foi demonstrada anteriormente. Davis et al. (2013) mostraram em seus estudos que macrófagos de camundongos diferenciados *in vitro* mudam as características de macrófagos M1 para M2 de acordo com a citocina presente no microambiente [124]. Esses pesquisadores mostraram que a polarização ocorre de maneira rápida, provado pela análise de expressão gênica, proteínas, metabólitos e atividade microbicida. As funções estabelecidas pelos fenótipos dos macrófagos eram perdidas e restabelecidas de forma dinâmica de acordo com as condições de sinalização por citocinas [124]. Essa versatilidade também foi descrita por Porcheray et al. (2005), que sugeriram que macrófagos em diferentes estágios de ativação poderiam ser rapidamente modificados em suas funções, ou seja, desempenhando funções inflamatórias em um dado momento de uma infecção e sequencialmente as mesmas células poderiam também participar na resolução da inflamação [125].

6. CONCLUSÕES

Tendo como base os dados obtidos, podemos concluir que macrófagos M1 e M2 podem atuar de maneira diferencial na paracoccidiodomicose. Macrófagos M1, aparentemente são mais capazes de restringir a disseminação do fungo pela formação de granulomas compactos, e maior produção de produção de H_2O_2 e NO. Além disso, esses macrófagos seriam fontes de citocinas e quimiocinas responsáveis pela diferenciação de linfócitos Th1 e Th17 e diminuição da diferenciação de Th2, que são relacionadas à resistência à infecção. Contudo, nossos dados também mostram que macrófagos M1 produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases de matriz, o que poderia levar à um processo inflamatório exacerbado e consequente lesão tecidual. Por outro lado, os macrófagos M2 aparentemente participam da supressão da resposta imunológica celular, principalmente pela produção de IL-10 e indução da diferenciação de linfócitos Th2 e Treg. Os macrófagos M2 também apresentam uma a maior capacidade fagocítica dessas células, embora proporcionalmente menor capacidade fungicida o que poderia ser relacionado ao processo de disseminação do fungo. Nossos dados também indicam que macrófagos M1 podem perder algumas de suas características inflamatórias por exposição prolongada ao fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. O mesmo sendo observado com macrófagos M2. Esses dados, em conjunto, sugerem que para a promoção de uma resposta imunológica efetiva contra o *P. brasiliensis* é necessária a participação equilibrada dos dois subtipos de células.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bocca, A.L., et al., *Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues*. Future Microbiol, 2013. **8**(9): p. 1177-91.
2. Shikanai-Yasuda, M., et al., *Consenso em paracoccidioidomicose*. Rev Soc Bras Med Trop, 2006. **39**(3): p. 297-310.
3. Matute, D.R., et al., *Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies*. Mol Biol Evol, 2006. **23**(1): p. 65-73.
4. Carrero, L.L., et al., *New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen*. Fungal Genet Biol, 2008. **45**(5): p. 605-12.
5. Teixeira, M.M., et al., *Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus*. Mol Phylogenet Evol, 2009. **52**(2): p. 273-83.
6. San-Blas, G., G. Nino-Vega, and T. Iturriaga, **Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics*. Med Mycol, 2002. **40**(3): p. 225-42.
7. Niño-Vega, G.A., et al., *Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis**. Med Mycol, 2000. **38**(1): p. 31-39.
8. Mendes-Giannini, M.J., et al., *Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(12): p. 2842-5.
9. Brummer, E., E. Castaneda, and A. Restrepo, *Paracoccidioidomycosis: an update*. Clin Microbiol Rev, 1993. **6**(2): p. 89-117.
10. Benard, G., et al., *Severe acute paracoccidioidomycosis in children*. Pediatr Infect Dis J, 1994. **13**(6): p. 510-5.
11. Castaneda, E., et al., *Impairment of cellular but not humoral immune responses in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice*. Infect Immun, 1988. **56**(7): p. 1771-7.
12. Kashino, S.S., et al., *Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(1): p. 89-97.

13. Calich, V.L., C.A. Vaz, and E. Burger, *Immunity to Paracoccidioides brasiliensis infection*. Res Immunol, 1998. **149**(4-5): p. 407-17; discussion 499-500.
14. Benard, G., et al., *Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis*. Cytokine, 2001. **13**(4): p. 248-52.
15. Mamoni, R.L., et al., *Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis*. Med Mycol, 2002. **40**(2): p. 153-9.
16. Oliveira, S.J., et al., *Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls*. Microbes Infect, 2002. **4**(2): p. 139-44.
17. Mamoni, R.L. and M.H. Blotta, *Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis*. Cytokine, 2006. **35**(3-4): p. 207-16.
18. Mamoni, R.L. and M.H. Blotta, *Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes Paracoccidioides brasiliensis infection from disease*. Cytokine, 2005. **32**(1): p. 20-9.
19. de Castro, L.F., et al., *Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis*. J Infect, 2013. **67**(5): p. 470-85.
20. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.
21. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 646-55.
22. Steinman, L., *A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage*. Nat Med, 2007. **13**(2): p. 139-45.
23. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 639-46.
24. O'Shea, J.J., et al., *Signal transduction and Th17 cell differentiation*. Microbes Infect, 2009. **11**(5): p. 599-611.
25. Yang, X.O., et al., *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 29-39.

26. Romani, L., *Immunity to fungal infections*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 275-88.
27. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity*. Adv Exp Med Biol, 2005. **560**: p. 11-8.
28. Brown, G.D., *Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 1-21.
29. Romani, L., *Immunity to fungal infections*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(1): p. 1-23.
30. Zelante, T., et al., *Receptors and pathways in innate antifungal immunity: the implication for tolerance and immunity to fungi*. Adv Exp Med Biol, 2007. **590**: p. 209-21.
31. Kechichian, T.B., J. Shea, and M. Del Poeta, *Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of Cryptococcus neoformans in immunodeficient mice*. Infect Immun, 2007. **75**(10): p. 4792-8.
32. Luther, K., et al., *Characterisation of the phagocytic uptake of Aspergillus fumigatus conidia by macrophages*. Microbes Infect, 2008. **10**(2): p. 175-84.
33. Calich, V.L., et al., *Innate immunity to Paracoccidioides brasiliensis infection*. Mycopathologia, 2008. **165**(4-5): p. 223-36.
34. Moreira, A.P., et al., *Killing of Paracoccidioides brasiliensis yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms*. Mycopathologia, 2008. **166**(1): p. 17-23.
35. Calvi, S.A., et al., *Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients*. Microbes Infect, 2003. **5**(2): p. 107-13.
36. do Nascimento, M.P., et al., *Fungicidal activity of human monocyte-derived multinucleated giant cells induced in vitro by Paracoccidioides brasiliensis antigen*. Mycopathologia, 2008. **166**(1): p. 25-33.
37. Cano, L.E., et al., *Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns*. Infect Immun, 1995. **63**(5): p. 1777-83.

38. Zak, D.E. and A. Aderem, *Systems biology of innate immunity*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 264-82.
39. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science. **327**(5963): p. 291-5.
40. Chai, L.Y., et al., *Fungal strategies for overcoming host innate immune response*. Med Mycol, 2009. **47**(3): p. 227-36.
41. Calich, V.L., et al., *Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008. **53**(1): p. 1-7.
42. Loures, F.V., et al., *TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 1279-90.
43. Loures, F.V., et al., *Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells*. Infect Immun. **78**(3): p. 1078-88.
44. Bonfim, C.V., R.L. Mamoni, and M.H. Blotta, *TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol, 2009. **47**(7): p. 722-33.
45. Taylor, P.R., et al., *Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection*. Nat Immunol, 2007. **8**(1): p. 31-8.
46. Hohl, T.M., A. Rivera, and E.G. Pamer, *Immunity to fungi*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(4): p. 465-72.
47. Brown, G.D., *Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 33-43.
48. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
49. Murray, P.J., et al., *Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 14-20.
50. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati, *Macrophage polarization comes of age*. Immunity, 2005. **23**(4): p. 344-6.
51. Sica, A., et al., *Macrophage polarization in tumour progression*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(5): p. 349-55.
52. Benoit, M., B. Desnues, and J.L. Mege, *Macrophage polarization in bacterial infections*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 3733-9.

53. Mantovani, A. and A. Sica, *Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(2): p. 231-7.
54. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
55. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
56. Siveen, K.S. and G. Kuttan, *Role of macrophages in tumour progression*. Immunol Lett, 2009. **123**(2): p. 97-102.
57. Mege, J.L., V. Mehraj, and C. Capo, *Macrophage polarization and bacterial infections*. Curr Opin Infect Dis, 2011. **24**(3): p. 230-4.
58. Redente, E.F., et al., *Differential polarization of alveolar macrophages and bone marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation*. J Leukoc Biol, 2011. **88**(1): p. 159-68.
59. Pina, A., S. Bernardino, and V.L. Calich, *Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(5): p. 1088-99.
60. Feriotti, C., et al., *Mannosyl-recognizing receptors induce an M1-like phenotype in macrophages of susceptible mice but an M2-like phenotype in mice resistant to a fungal infection*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54845.
61. Elkington, P.T. and J.S. Friedland, *Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology*. Thorax, 2006. **61**(3): p. 259-66.
62. Huang, W.C., et al., *Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor-kappaB*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42507.
63. Roma-Lavisce, C., et al., *M1 and M2 macrophage proteolytic and angiogenic profile analysis in atherosclerotic patients reveals a distinctive profile in type 2 diabetes*. Diab Vasc Dis Res, 2015. **12**(4): p. 279-89.
64. Majka, S.M., et al., *Cryptococcus neoformans pulmonary granuloma formation is associated with matrix metalloproteinase-2 expression*. Med Mycol, 2002. **40**(3): p. 323-8.

65. Nishikaku, A.S., et al., *Matrix metalloproteinases with gelatinolytic activity induced by Paracoccidioides brasiliensis infection*. Int J Exp Pathol, 2009. **90**(5): p. 527-37.
66. Neworal, E.P., et al., *Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis*. Cytokine, 2003. **21**(5): p. 234-41.
67. de Carli, M.L., et al., *M2 macrophages and inflammatory cells in oral lesions of chronic paracoccidioidomycosis*. J Oral Pathol Med, 2015.
68. Fornazim, M.C., et al., *Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis*. Eur Respir J, 2003. **22**(6): p. 895-9.
69. Batista, A.C., C.T. Soares, and V.S. Lara, *Failure of nitric oxide production by macrophages and decrease in CD4+ T cells in oral paracoccidioidomycosis: possible mechanisms that permit local fungal multiplication*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2005. **47**(5): p. 267-73.
70. Flavia Popi, A.F., J.D. Lopes, and M. Mariano, *GP43 from Paracoccidioides brasiliensis inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus*. Cell Immunol, 2002. **218**(1-2): p. 87-94.
71. Das, P., A. Lahiri, and D. Chakravorty, *Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator*. PLoS Pathog, 2010. **6**(6): p. e1000899.
72. Lacey, D.C., et al., *Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models*. J Immunol, 2012. **188**(11): p. 5752-65.
73. Camargo, Z.P., et al., *The use of cell-free antigens of Paracoccidioides brasiliensis in serological tests*. J Med Vet Mycol, 1991. **29**(1): p. 31-8.
74. Doughty, B.L., et al., *Granulomatous hypersensitivity to Schistosoma mansoni egg antigens in human schistosomiasis. I. Granuloma formation and modulation around polyacrylamide antigen-conjugated beads*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1987. **82**(Sup. IV): p. 47-54.
75. Elbim, C. and G. Lizard, *Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations*. Cytometry A, 2009. **75**(6): p. 475-481.
76. Hume, D.A., *Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(6): p. 432-41.

77. Van Ginderachter, J.A., et al., *Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 487-501.
78. Martinez-Pomares, L. and S. Gordon, *Antigen presentation the macrophage way*. Cell, 2007. **131**(4): p. 641-3.
79. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
80. Huang, Z., et al., *Mycobacterium tuberculosis-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129744.
81. Wang, H., et al., *An in vitro model of Mycobacterium leprae induced granuloma formation*. BMC Infect Dis, 2013. **13**: p. 279.
82. Nascimento, F.R., et al., *Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4593-600.
83. Roilides, E., et al., *IL-10 exerts suppressive and enhancing effects on antifungal activity of mononuclear phagocytes against Aspergillus fumigatus*. J Immunol, 1997. **158**(1): p. 322-9.
84. Krampert, M., et al., *Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5242-54.
85. Opdenakker, G., et al., *Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 851-9.
86. Vincenti, M.P., et al., *Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1996. **6**(4): p. 391-411.
87. Bonfim, C.V., et al., *TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol, 2009: p. 1-12.
88. Brown, G.D. and S. Gordon, *Immune recognition. A new receptor for beta-glucans*. Nature, 2001. **413**(6851): p. 36-7.

89. Loures, F.V., et al., *TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by Paracoccidioides brasiliensis stimulated dendritic cells*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 261.
90. Feriotti, C., et al., *Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 913.
91. Loures, F.V., et al., *Dectin-1 Induces M1 Macrophages and Prominent Expansion of CD8+IL-17+ Cells in Pulmonary Paracoccidioidomycosis*. J Infect Dis, 2014.
92. Suttmüller, R.P., et al., *Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells*. J Clin Invest, 2006. **116**(2): p. 485-94.
93. Gaddis, D.E., et al., *Role of TLR2-dependent IL-10 production in the inhibition of the initial IFN-gamma T cell response to Porphyromonas gingivalis*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(1): p. 21-31.
94. Re, F. and J.L. Strominger, *IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7548-55.
95. Netea, M.G., et al., *Toll-like receptor 2 suppresses immunity against Candida albicans through induction of IL-10 and regulatory T cells*. J Immunol, 2004. **172**(6): p. 3712-8.
96. Capsoni, F., et al., *IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(3): p. 351-8.
97. Spittler, A., et al., *IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis*. Immunology, 1995. **85**(2): p. 311-7.
98. Bogdan, C., Y. Vodovotz, and C. Nathan, *Macrophage deactivation by interleukin 10*. J Exp Med, 1991. **174**(6): p. 1549-55.
99. Oswald, I.P., et al., *IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity*. J Immunol, 1992. **148**(11): p. 3578-82.

100. Muzio, M., et al., *Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5998-6004.
101. Buechler, C., et al., *Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 97-103.
102. Calvi, S.A., et al., *Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes*. Microbes Infect, 2003. **5**(15): p. 1373-9.
103. Gonzalez, A., et al., *Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against Paracoccidioides brasiliensis conidia*. Infect Immun, 2000. **68**(5): p. 2546-52.
104. Huang, W., et al., *Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice*. J Infect Dis, 2004. **190**(3): p. 624-31.
105. Zelante, T., et al., *IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance*. Eur J Immunol, 2007. **37**(10): p. 2695-706.
106. Romani, L., *Cell mediated immunity to fungi: a reassessment*. Med Mycol, 2008: p. 1-15.
107. Rudner, X.L., et al., *Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine Pneumocystis carinii infection*. Infect Immun, 2007. **75**(6): p. 3055-61.
108. Heninger, E., et al., *Characterization of the Histoplasma capsulatum-induced granuloma*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3303-13.
109. Kleinschek, M.A., et al., *IL-23 enhances the inflammatory cell response in Cryptococcus neoformans infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 1098-106.
110. Pagliari, C., et al., *Paracoccidioidomycosis: Cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions*. Microb Pathog, 2011.
111. Snapper, C.M., F.D. Finkelman, and W.E. Paul, *Regulation of IgG1 and IgE production by interleukin 4*. Immunol Rev, 1988. **102**: p. 51-75.
112. Baida, H., et al., *Differential antibody isotype expression to the major Paracoccidioides brasiliensis antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis*. Microbes Infect, 1999. **1**(4): p. 273-8.

113. Calich, V.L. and S.S. Kashino, *Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of Paracoccidioides brasiliensis infection*. Braz J Med Biol Res, 1998. **31**(5): p. 615-23.
114. Pina, A., et al., *Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2369-78.
115. Trifari, S., et al., *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 864-71.
116. Zheng, Y., et al., *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 282-9.
117. Sonnenberg, G.F., et al., *CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut*. Immunity. **34**(1): p. 122-34.
118. Aujla, S.J. and J.K. Kolls, *IL-22: a critical mediator in mucosal host defense*. J Mol Med, 2009. **87**(5): p. 451-4.
119. Aujla, S.J., et al., *IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 275-81.
120. De Luca, A., et al., *IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance*. Mucosal Immunol, 2010. **3**(4): p. 361-73.
121. Zelante, T., et al., *IL-22 in antifungal immunity*. Eur J Immunol, 2011. **41**(2): p. 270-5.
122. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
123. Ferreira, M.C., et al., *Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis*. Infect Immun, 2010. **78**(10): p. 4392-401.
124. Davis, M.J., et al., *Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in Cryptococcus neoformans infection*. MBio, 2013. **4**(3): p. e00264-13.
125. Porcheray, F., et al., *Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(3): p. 481-9.

8. APÊNDICE

8.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 17/02/12
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1253/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1156.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1 E M2 NA RESPOSTA CONTRA O FUNGO DIMÓRFICO PARACOCIDIÓIDES BRASILIENSIS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Munir Regini Paião

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 01/12/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 17/02/13 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II – OBJETIVOS.

Avaliar a participação de macrófagos M1 e M2 na resposta imunológica contra o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, causador da paracoccidioidomicose.

III – SUMÁRIO.

São escassos os estudos sobre o papel dos macrófagos M1 e M2 nas infecções fúngicas. É possível que participem da modulação da resposta imune adaptativa, promovendo resistência ou susceptibilidade à doença e caracterizando as duas formas clínicas da paracoccidioidomicose. Para verificar tal papel dos macrófagos, serão utilizadas células de sangue periférico de indivíduos saudáveis. Serão isolados os macrófagos e caracterizados seus subtipos. Em biópsias de pacientes, serão feitas análises fenotípicas dos macrófagos das lesões de mucosa ou linfonodos, utilizando para tal as biópsias embebidas em parafina, arquivadas no setor de anatomia patológica do HC/Unicamp.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

 www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de dezembro de 2011.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP